N° d'enregistrement au C.N.R.S.
AO 8101

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Danièle CARRE

ETUDE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE DE ESCHERICHIA COLI

Soutenue le 22 janvier 1973, devant la Commission d'Examen

MM.	F. GROS	Président
	F. CHAPEVILLE	
	P. FROMAGEOT	Examinateurs
Mme	M. GRUNBERG-MANAGO	

N° d'enregistrement au C.N.R.S.
AO 8101

T H E S E

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS VII

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES - SCIENCES NATURELLES

par

Danièle CARRE

ETUDE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE DE ESCHERICHIA COLI

Soutenue le 22 janvier 1973, devant la Commission d'Examen

MM.	F. GROS	Président
	F. CHAPEVILLE	
	P. FROMAGEOT	Examinateurs
Mme	M. GRUNBERG-MANAGO	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Pr. F. CHAPEVILLE, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a fait bénéficier de sa compétence et de son enthousiasme.

Je suis extrêmement reconnaissante envers le Dr. P. FROMAGEOT de l'aide qu'il m'a prodiguée, tant en me donnant les moyens matériels de réaliser cette étude, que par l'intérêt constant qu'il y a porté.

Je prie le Dr. M. GRUNBERG-MANAGO et le Pr. F. GROS qui, avec eux, m'ont fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse, de trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je remercie A. SENTENAC et J.M. BUHLER, ainsi que A. FAVRE de leur collaboration; W. GUSCHLBAUER et G. HERVE de leurs critiques et de leurs conseils et A.L. HAENNI de son infinie patience.

J'ai bénéficié , au cours de ce travail, du dynamisme de Simon LITVAK et pu apprécier sa chaleureuse amitié et celle de Laura, sa femme.

Que toutes celles et tous ceux, enfin, qui m'ont soutenue par leur aide, leurs conseils ou tout simplement leur sourire, soient assurés de ma très profonde gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548022_0026

Une partie de ce travail a déjà fait l'objet des publications suivantes :

1 - Purification and properties of the CTP(ATP) tARN-nucleotidyl-transferase from E. coli.
D.S. CARRE, S. LITVAK and F. CHAPEVILLE.
Biochim. Biophys. Acta 224, 371, (1970)

2 - TYMV-RNA as a substrate of the tRNA-nucleotidyltransferase.
S. LITVAK, D.S. CARRE and F. CHAPEVILLE.
FEBS Letters 11, 316, (1970)

3 - Synthesis and properties of the Sephrose-bound tRNA nucleotidyl-transferase.
S. LITVAK, L. TARRAGO-LITVAK, D.S. CARRE and F. CHAPEVILLE.
Eur. J. Biochem. 24, 249, (1971)

SOMMAIRE

INTRODUCTION. p : 7

I - MATERIEL ET METHODES.

MATERIEL. p : 13

METHODES.

A / DOSAGE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE.

1 - Incorporation d'AMP. p : 15
2 - Incorporation de CMP. p : 15
3 - Modification de ces tests dans le cas où l'on utilise des nucléotides à très haute activité spécifique. p : 15
4 - Définition de l'unité enzymatique. p : 16
5 - Dosage de l'activité pyrophosphorylase de la tARN nucléotidyltransférase. p : 16

B / MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE DIVERSES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

1 - Activité RNAase. p : 16
2 - Activité pyrophosphatase. p : 16
3 - Activité nucléotidase. p : 17
4 - Activité poly A synthétase. p : 18
5 - Activité PNPase. p : 18
6 - Activité ARN polymérase. p : 18
7 - Activité aminoacyl tARN synthétase. p : 18

C / DOSAGE DES PROTEINES ET DES ACIDES NUCLEIQUES. p : 19

D / PREPARATION DES tARN SUBSTRATS.

1 - Hydrolyse ménagée par la phosphodiestérase de venin de serpent. p : 19
2 - Dégradations récurrentes par le periodate. p : 20

E / PREPARATION DE tARN MARQUES DANS L'EXTREMITE 3' TERMINALE.
1 - Préparation. p : 21
2 - Analyse de ces produits. p : 21

F / ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE. p : 22

G / CULTURE DE PHAGE T_4. p : 22

H / EXTRACTION DE L'ADN DU PHAGE T_4. p : 23

I / TRANSCRIPTION DE L'ADN DU PHAGE T_4. p : 23

II - PURIFICATION DE L'ENZYME.

A / ETAPES DE LA PURIFICATION.
1 - Préparation de l'homogénat brut. p : 24
2 - Précipitation à la streptomycine p : 24
3 - Précipitation à la protamine. p : 24
4 - Précipitation au sulfate d'ammonium. p : 25
5 - Chromatographie sur DEAE-cellulose. p : 25
6 - Filtration sur Sephadex G-200. p : 25
7 - Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. p : 26
8 - Deuxième chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. p : 26
9 - Centrifugation en gradient de glycerol. p : 27
10 - Electrofocalisation. p : 27

B / BILAN DE LA PURIFICATION. p : 31

C / PURETE DE L'ENZYME.
1 - Spectre d'absorption. p : 31
2 - Activité spécifique et turn-over. p : 34
3 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide. p : 34

D / CARACTERISATION DE L'ENZYME.
1 - Poids moléculaire. p : 36
2 - Point isoélectrique. p : 37

III - ETUDE DE LA SPECIFICITE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE.

A / SPECIFICITE A L'EGARD DES NUCLEOTIDES.

1 - Nature des nucléotides incorporés. p : 38

2 - Incorporation de ces nucléotides dans des tARN de divers degré de dégradation. p : 38

3 - Séquences formées.

a) Incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpC. p : 45

b) Incorporation d'AMP dans le tARN-pX. p : 45

c) Incorporation de CMP dans le tARN-pXpC. p : 45

d) Incorporation de CMP dans le tARN-pX. p : 45

e) Incorporation d'UMP dans le tARN-pX. p : 45

f) Incorporation de CMP dans le tARN-pXpU. p : 46

g) Incorporation d'UMP dans le tARN-pXpC. p : 46

h) Incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpU. p : 46

4 - Vitesse d'incorporation des divers nucléotides. p : 46

5 - Réaction de pyrophosphorolyse. p : 47

Discussion. p : 48

B / EFFET DU pH ET DES IONS.

1 - EFFET DU pH. p : 50

2 - EFFET DES IONS.

a) Effet des métaux divalents. p : 51

b) Effet des amines. p : 56

c) Effet des autres ions. p : 57

Conclusion. p : 59

C / SPECIFICITE A L'EGARD DU SUBSTRAT POLYNUCLEOTIDIQUE.

1 - tARN MODIFIES.

a - Effet des colorants.

α) Action du chlorhydrate de proflavine. p : 60

β) Action du bromure d'éthidium. p : 61

Conclusion.

b - Formation de liaisons covalentes dans la molécule de tARN.

α) Action du formol. p : 64

β) Effet de la formation d'une liaison covalente entre 4 TU (8) et C (13). p : 65

Conclusion.

2 - ARN DU VIRUS DE LA MOSAIQUE JAUNE DU NAVET.

a) Incorporation d'AMP catalysée par la tARN nucléotidyltransférase. p : 73

b) Incorporation de CMP après traitement à la phosphodiestérase de venin. p : 73

Conclusion.

3 - tARN DU PHAGE T_4 SYNTHETISES IN VITRO. p : 77

4 - AUTRES ARN ET POLYMERES SYNTHETIQUES.

Résultats. p : 80

Discussion. p : 82

IV - ETUDE DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE.

A / ETUDE CINETIQUE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE.

1 - MODE D'ADDITION DES NUCLEOTIDES AU tARN-pX. p : 84

2 - DETERMINATION DES K_M APPARENTS DE L'ENZYME A L'EGARD DES NUCLEOTIDES.

Résultats. p : 87

Discussion. p : 88

3 - INFLUENCE D'UN NUCLEOTIDE SUR LA VITESSE D'INCORPORATION D'UN AUTRE.

Résultats. p : 92

Discussion. p : 94

4 - DETERMINATION DES K_M ET K_i APPARENTS DE L'ENZYME A L'EGARD DES tARN.

Résultats et discussion. p : 98

5 - RELATION D'INHIBITION ENTRE CTP ET tARN-pXpCpC DANS LA REACTION D'INCORPORATION d'AMP DANS ce tARN. p :101

Conclusion. p :103

B / ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE L'ENZYME ET SES SUBSTRATS.

1 - ETUDE DE LA THERMODENATURATION DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE.

a) Inactivation thermique en l'absence d'effecteur. p :105

b) Comportement de la tARN nucléotidyl-transférase en présence de diverses substances. p :106

c) Variation de l'effet protecteur du tARN en fonction de la température. p :110

d) Variation de l'effet protecteur du tARN en fonction de sa concentration. p :111

Discussion. p :115

2 - PROTECTION DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE CONTRE LA PROTEOLYSE PAR SES SUBSTRATS. p :118

3 - ROLE DES GROUPEMENTS SH DANS L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

a) Effet des agents réducteurs. p :118

b) Effet des réactifs des thiols. p :121

α) Réduction de la tARN nucléotidyl-transférase. p :121

β) Effet de l'addition de DTNB au milieu réactionnel. p :121

γ) Effet de la NEM sur les diverses activités de la tARN nucléotidyltransférase. p :125

δ) Effet des substrats sur l'action des réactifs des SH. p :127

Effet des nucléotides. p :127

Effet des acides nucléiques. p :127

Conclusion. p :127

4 - MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE ENZYME-tARN PAR CENTRIFUGATION

Résultats. p :131

Conclusion. p :134

RESUME - CONCLUSION GENERALE. p :136

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. p :144

INTRODUCTION

Tous les tARN dont la structure est connue à ce jour, possèdent la même séquence 3' terminale -pCpCpA, et c'est au ribose de l'adénosine terminale que sont attachés les acides aminés, en présence d'ATP et des aminoacyltARN synthétases spécifiques, lors du processus de biosynthèse des proteines. Si le tARN perd un ou plusieurs nucléotides il perd sa capacité d'accepter les acides aminés (1) et de se fixer aux ribosomes (2).

Alors que la molécule de tARN dans son ensemble est très stable, l'AMP terminale subit in vivo un renouvellement appréciable. Ce phénomène a été mis en évidence tant chez les organismes eucaryotes (3 à 9), que chez E. coli (10 à 12). La signification biologique de ce fait est inconnue. Chez E. coli, ce renouvellement, constant quel que soit le taux de croissance, est d'environ 20 % par génération (11). Dans des réticulocytes de lapin, HOLT et al (3 et 8) ont mis en évidence un renouvellement plus lent des CMP qui précèdent l'AMP terminale, renouvellement non observé dans les autres cas, bien qu'à l'extraction les tARN de levure présentent une dégradation de la séquence 3' terminale plus ou moins importante suivant les conditions de culture (7 et 13).

Une enzyme susceptible de catalyser la synthèse de la séquence 3' terminale-pCpCpA des tARN à partir d'ATP et de CTP a été mise en évidence par HEIDELBERGER et al. en 1956 dans le foie de rat (14), puis retrouvée dans tous les organismes étudiés : bactéries (15 à 21), levures (22 à 24) et organismes supérieurs (25 à 32). Il a été établi que cette enzyme catalyse la réaction :

$$\text{tARN-pX} + 2\ \text{CTP} + \text{ATP} \dashrightarrow \text{tARN-pXpCpCpA} + 3\ \text{PPi}.$$

Nommée tout d'abord tARN pyrophosphorylase, elle reçu ensuite le nom de tARN nucléotidyltransférase en raison de la très faible réversibilité de la réaction ci-dessus. En effet, il est peu probable que cette

enzyme puisse être responsable des deux étapes nécessaires au renouvellement de l'AMP terminale des tARN, en raison de la forte concentration en ATP intracellulaire et de l'élimination rapide du pyrophosphate par des pyrophosphatases. L'enzyme responsable de la dégradation est encore inconnu, il s'agit d'une exonucléase, peut-être la RNAase II chez E. coli (12). Le degré de dégradation des tARN à l'extraction traduit l'équilibre entre cette activité et celle de la tARN nucléotidyltransférase. Le renouvellement de l'AMP terminale peut être observé également in vitro avec des extraits bruts de E. coli, levure et d'autres organismes et il a été montré que dans ce cas là la tARN nucléotidyltransférase n'est pas responsable de la dégradation (32).

Le renouvellement n'affectant pratiquement que l'AMP terminale in vivo, on peut se demander pourquoi un enzyme susceptible de resynthétiser la totalité de la séquence -pCpCpA a été maintenu et est aussi généralement répandu. L'hypothèse a été avancée par de nombreux auteurs, qu'outre le rôle de réparation, la tARN nucléotidyltransférase pourrait jouer un rôle dans la synthèse même des tARNs. La séquence du DNA correspondant aux trois nucléotides terminaux communs aux divers tARN pourrait être absente des gènes correspondants et ces nucléotides ajoutés après la transcription par la tARN nucléotidyltransférase. Cet enzyme interviendrait donc, avec les nucléases spécifiques, les méthylases, les thiolases et les enzymes de formation du pseudo uracile, au cours de la maturation du tARN, processus conduisant d'un précurseur inactif, direct produit de transcription du gène du tARN par l'ARN polymérase au tARN mature et fonctionnel. DANIEL et al. (33) ayant démontré que lors de l'hybridation du tARN de E. coli avec l'ADN dénaturé correspondant les deux derniers nucléotides au moins de l'extrémité -CCA restent sensibles à la RNAase pancréatique, c'est-à-dire sont non appariés, ont conclu en faveur de cette thèse. Cependant, plus récemment, ALTMAN et SMITH (34, 35) ont purifié et analysé un tARN précurseur du $tARN^{tyr}$ spécial supresseur du codon ambre, dont le gène est porté par l'ADN du phage transducteur Ø 80 pSu_3^+. De grandes quantités de ce tARN sont synthétisées lors de l'infection d'une bactérie par ce phage. Le précurseur in vivo est très instable (demi-vie de 3 mn à 25°) et n'a pu être mis en évidence que par des

techniques de marquage à très haute activité spécifique, d'extraction rapide et l'existence de mutants déficients dans le processus de maturation. L'analyse par finger-print de ce précurseur a montré que la molécule correspondait à celle du tARN mature, prolongée à l'extrémité 5' par une séquence de 41 nucléotides et à l'extrémité 3' par les trois nucléotides UCU au-delà de la terminaison normale -CCA. L'endonucléase responsable du clivage du polynucléotide excédentaire à l'extrémité 5' a été isolée, mais il semble que l'extrémité 3' de la molécule soit dégagée par action d'une exonucléase. Si ce fait devait être généralisé il n'en demeurerait pas moins que la tARN nucléotidyltransférase peut jouer à ce niveau un rôle de régularisation du découpage accompli par l'exonucléase. En effet, dans les tARN natifs les deux nucléotides terminaux -CA sont très sensibles à l'action de telles nucléases, le troisième nucléotide étant plus protégé par la structure secondaire du tARN (36).

La tARN nucléotidyltransférase présente en outre un intérêt pour l'étude du mécanisme de polymérisation des nucléosides triphosphate. En dehors des ARNpolymérases, ADN-dépendantes ou ARN-dépendantes, synthétisant des produits dont la séquence est déterminée par celle de la matrice utilisée par un mécanisme reposant sur la complémentarité des bases, on connait un grand nombre d'enzymes capables de catalyser l'addition sur un polynucléotide de nucléosides triphosphates (37 à 53), dont le mieux étudié est la poly A polymérase (54 à 55) de E. coli. Ces enzymes utilisent un oligo ou polynucléotide comme initiateur, des nucléosides triphosphates comme substrat et un métal divalent comme effecteur. Les produits de réaction sont des homo- ou des hétéroribopolymères, de longueur variable, attachés de façon covalente au polynucléotide initiateur. Ces enzymes ne possèdent pas une spécificité très étroite à l'égard de l'initiateur. Un cas un peu particulier est celui de la tARN cytidylyltransférase de thymus de veau (39) qui catalyse uniquement l'incorporation d'un nombre limité de résidus CMP non pas sur un polynucléotide initiateur quelconque mais sur du tARN natif. La tARN nucléotidyltransférase, par contre, bien qu'enzyme assez simple du fait de sa taille, catalyse l'addition, exclusivement au tARN d'une séquence de nucléotides dont l'ordre et la longueur sont parfaitement déterminés (avec les réserves faites

dans la suite de l'exposé), et ceci, par un mécanisme peut-être autre que celui qui repose sur la complémentarité des bases.

Nous avons purifié la tARN nucléotidyltransférase environ 100 000 fois et étudié divers aspects de l'activité de cet enzyme en essayant de cerner les limites de sa spécificité à l'égard des nucléotides et des polynucléotides pour mieux comprendre le mécanisme de son action et le rôle qu'elle peut jouer dans la cellule. Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec Simon LITVAK qui s'orienta plus particulièrement vers l'utilisation de l'enzyme dans l'étude d'autres molécules, notamment l'ARN du TYMV, ce qui fit l'objet de sa thèse de Doctorat en Mars 1972.

ENZYMES

tARN nucléotidyltransférase :	EC 2.7.7.25
phosphatase alcaline de E. coli :	EC 3.1.3.1
RNAase pancréatique :	EC 2.7.7.16
Phosphidiestérase de venin de serpent :	EC 3.1.4.1
ATP polynucléotide adenyltransférase :	EC 2.7.7.19
ARN polymerase de E. coli	EC 2.7.7.6
RNAase T_1	EC 2.7.7.26
ADN polymerase	EC 2.7.7.7
Aminoacyl-tARN synthétases	EC 6.1.1.

ABREVIATIONS

tARN	: ARN de transfert
tARN-pX ou $tARN_{-3}$	: tARN dépourvu de la séquence 3' terminale pCpCpA.
tARN-pXpC ou $tARN_{-2}$	: tARN dépourvu de la séquence 3' terminale pCpA.
tARN-pXpCpC ou $tARN_{-1}$	: tARN dépourvu de l'adenosine monophosphate terminale.
tARN-pXpCpCpA ou $tARN_{o}$	: tARN à séquence 3' terminale complète.
TYMV	: Virus de la mosaique jaune du navet.
TMV	: Virus de la mosaique du tabac.
r ARN	: ARN ribosomal.
Tris	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.
TCA	: Acide trichloroacétique.
PCA	: Acide perchlorique.
PPO	: 1,4-bis- 2-(4 méthyl-5-phényloxazolyl) benzène.
diméthyl POPOP	: diméthyl 2,5-diphényloxazole.
EDTA	: Acide éthylène diamine tétracétique.
SAB	: Sérum albumine bovine.
AMP-PCP	: $\beta - \gamma$ méthylène adénosine triphosphate.
AMP-CPP	: $\alpha - \beta$ méthylène adénosine triphosphate.
DTNB	: Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoique).
NEM	: N-éthyl maléimide.
SSC	: Solution standard de citrate de sodium (Citrate de Na 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH ajusté à 7,0).
VPD	: Phosphodiestérase de venin de serpent.
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium.
PPi	: Pyrophosphate.

- I -

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

PRODUITS PEU COURANTS.

^{3}H-5 - CTP	(17,9 C / mmole)	Schwarz Bio Research.
^{3}H-8 - ATP	(22,7 C / mmole)	Schwarz Bio Research.
^{3}H-5 - UTP	(10 - 14 C / mmole)	CEA, Saclay ou Radiochem. Cent. Amers.
^{14}C - CTP	(308 mC / mmole)	CEA, Saclay.
α-^{32}P - ATP	(600-1200 mc / mmole)	CEA, Saclay ou Radiochem. Cent. Amers.
α-^{32}P - CTP	(800-1200 mC / mmole)	CEA, Saclay ou Radiochem. Cent. Amers.
^{14}C - valine	(108 mC / mmole)	CEA, Saclay.
^{14}C - acides aminés (mélange)	(10 mC /mmole)	Radiochemical Centre, Amersham.
^{14}C - formol	(6 mC / mmole)	CEA, Saclay.
Nucléotides		P.L. Biochemicals.
Polymères synthétiques.		Miles Laboratories.
AMPPCP et AMPCPP		Miles Laboratories.
ATN (ATP impur)		Bio Springer.
Bromhydrate d'éthidium		Boots Pure Drug Co. Ldt.
Chlorhydrate de proflavine.		Mann Research Laboratories.
DTNB		Sigma.
NEM		Mann Research Laboratories.
Phosphate de spermidine		Mann Research Laboratories.
RNAase pancréatique		Worthington
Phosphodiestérase de venin de serpent (potentiel 0,3)		Worthington
Phosphatase alcaline de E. coli		Worthington
DNAase I		Worthington
RNAase T_1		Worthington
Trypsine		Worthington

Inhibiteur du soja	Mann Research Laboratories.
tARN de *E. coli B*	General Biochemicals.
tARN de levure	General Biochemicals.
Hémoglobine de lapin	Don du Dr. S. HARBON.
ARN polymérase de *E. coli*	Don du groupe du Dr. A. SENTENAC (Saclay)
Facteur ρ	Préparé par J.M. BUHLER (Service de Biochimie, Saclay).
Aminoacyl-tARN synthétases brutes de *E. coli*	Don des Drs. P. YOT et A.L. HAENNI (IBM, Paris)
ARN 5S	Don du Dr. HAYES.

METHODES

A/ DOSAGE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE.

L'activité enzymatique est déterminée dans les conditions suivantes :

1) Incorporation d'AMP.

Dans un volume final de 0,2 ml, le mélange réactionnel contient : 10 µmoles de tampon Tris-HCl, pH 8,5, 2 µmoles d'acétate de Mg^{++}, 0,4 µmoles de βmercaptoéthanol, 20 nmoles de ^{3}H-ATP (activité spécifique 6000 cpm par nmole), 4 nmoles de tARN de levure (environ 40 % de tARN-pXpCpC) et 0,01 - 20 µg d'enzyme selon le stade de purification. Le mélange est incubé à 37° pendant des temps variables. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml de sérum albumine à 50 µg/ml et de 0,2 ml de TCA 50 % glacé contenant 3 % d'ATP non radioactif (Springer). Le précipité est recueilli par filtration sur filtre en fibres de verre Whatman GF/A et lavé avec 50 ml de TCA 5 % froid. Les filtres sont séchés et leur radioactivité déterminée en présence de mélange scintillant : toluène, PPO, diméthyl POPOP.

2) Incorporation de CMP :

Le mélange réactionnel ne diffère du précédent que par l'utilisation de 20 nmoles de ^{3}H-CTP (activité spécifique environ 8600 cpm par nmole) au lieu d'ATP et de tARN de E. coli traité, dépourvu des 3 nucléotides 3' terminaux ($tARN_{-3}$).

3) Modification de ces tests dans le cas où l'on utilise des nucléotides à très forte activité spécifique :

Dans certains cas il a été nécessaire d'utiliser des nucléotides ayant une activité spécifique beaucoup plus importante, allant jusqu'à 2000 cpm par pmole ; le processus de décontamination a été alors modifié comme suit : La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1 ml de sérum albumine bovine à 1 mg/ml et 0,2 ml de TCA à 50 % glacé contenant 3 % d'ATP (Springer). Après centrifugation à

4000 tours/mn (centrifugeuse de paillasse Couprie) pendant 2 mn le surnageant est éliminé et le culot redissous dans 150 µl de NaOH 0,2 N à froid, puis dilué par 2 ml d'une solution neutre à 3 % d'ATP dans l'eau et reprécipité par addition de 250 µl de TCA à 50 %. Après 3 cycles successifs le précipité d'acides nucléiques est filtré sur filtre en fibres de verre Whatman GF/A, lavé, séché et compté selon la technique décrite précédemment.

4) Définition de l'unité enzymatique :

Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'incorporation d'une pmole d'AMP dans du tARN de levure (-pXpCpC) en 1 mn dans les conditions standards.

5) Dosage de l'activité pyrophosphorylase de la tARN nucléotidyltransférase.

Il est effectué selon la technique de PREISS et col. (1), en mesurant la radioactivité qui apparait sous forme d'ATP et de CTP en utilisant du ^{32}P-pyrophosphate et du tARN complet comme substrats de l'enzyme.

B / MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DE DIVERSES ACTIVITES POUVANT CONTAMINER LES PREPARATIONS.

1) Activité RNAase

Cette mesure repose sur la perte de matériel acidoprécipitable après incubation d'ARN-^{14}C totaux de E. coli en présence d'une quantité de préparation enzymatique supérieure à celle utilisée dans un test enzymatique durant 24 heures dans un milieu réactionnel analogue à celui du test de la tARN nucléotidyltransférase.

2) Activité pyrophosphorylase.

La mise en évidence qualitative, très sensible, de cette

activité est l'incubation de la préparation enzymatique dans les conditions standards de dosage de la tARN nucléotidyltransférase en présence de ^{32}P-pyrophosphate, la formation de phosphate est ensuite mise en évidence par électrophorèse sur papier Whatman n° 3, à 27 V/cm pendant 1 heure en tampon citrate de Na 0,05 M, pH 3,6.

Pour un dosage de cette activité plus maniable bien que moins sensible nous utilisons la technique de LOWRY et LOPEZ (60) pour doser le phosphate libéré par hydrolyse du pyrophosphate. La préparation enzymatique à tester est ajoutée à un milieu réactionnel contenant dans un volume de 200 µl : 10 µmoles de tampon Tris-HCl, pH 8,5 2 µmoles d'acétate de Mg^{++}, 0,4 µmoles de βmercaptoéthanol et 0,1 µmoles de pyrophosphate de Na. Après incubation à 37°, on ajoute 0,8 ml d'acétate de Na 1 M, pH 4,0 puis 0,1 ml d'acide ascorbique à 1 % et 0,1 ml de molybdate d'ammonium à 1 % dans l'acide sulfurique 0,05 N. L'absorption à 700 nm est lue après 15 mn. Le βmercaptoéthanol donnant une intensification de la coloration, il est nécessaire de réaliser la gamme de phosphate dans un milieu de composition aussi voisine que possible de celle du test.

3) Activité nucléotidase.

Deux techniques ont été utilisées pour doser cette activité. La première est analogue au dosage de l'activité pyrophosphatase. Le milieu d'incubation, de même composition renferme 50 nmoles d'ATP au lieu de pyrophosphate. Après 2 heures d'incubation à 37° il est traité de la même manière. Un témoin avec de la phosphatase alcaline de E. coli est conduit en même temps. La sensibilité de ce dosage est d'environ 40 pmoles de phosphate libérées par minute.

La seconde technique fait usage d'ATP γ ^{32}P. Le phosphate radioactif produit par hydrolyse de l'ATP est isolé et dosé selon la méthode de Kolakofsky et col. (61). Le phosphate ^{32}P est extrait

sous forme de complexe phosphomolybdique par un mélange de benzène-alcool isobutyrique et sa radioactivité déterminée. La sensibilité de ce test dépend de l'activité spécifique de l'ATP γ-^{32}P utilisé et peut être beaucoup plus grande que celle de la méthode précédente.

4) Activité poly A synthétase.

Le milieu réactionnel renferme, dans un volume de 200 µl : 10 µmoles de tampon Tris-HCl, pH 8,5, 2 µmoles d'acétate de Mg^{++}, 0,4 µmoles de βmercaptoéthanol, 1 nmole de ^{3}H-ATP (activité spécifique environ 2. 10^{6} cpm par nmole) 10 µg de poly A et une quantité d'enzyme supérieure à celle utilisée pour une mesure de l'activité de la tARN nucléotidyltransférase. Après une incubation de 2 heures à 37 ° le traitement à la soude du précipité d'acides nucléiques est appliqué en raison de la forte activité spécifique de l'ATP utilisé. La sensibilité de ce test est de 10^{-4} pmoles d'AMP incorporés par minute.

5) Activité PNPase.

Elle est mesurée par la phosphorolyse du polyU selon la technique de SINGER et col. (62).

6) Activité ARNpolymérase.

Le dosage est effectué selon la technique de CHAMBERLIN et BERG (63).

7) Activité aminoacyl-tARN synthétase.

Dans un volume de 100 µl, le mélange réactionnel contient : 10 µmoles de tampon cacodylate de Na, pH 7,4, 1 µmole de KCl, 1 µmole d'acétate de Mg^{++} 0,2 µmoles de βmercaptoéthanol, 0,2 µmoles d'ATP, 100 µg de tARN de E. coli, 62,5 nmoles d'un mélange de 14 acides aminés ^{14}C d'activité spécifique égale à 10 mCi / mmole et une quantité de préparation enzymatique supérieure à celle normalement utilisée dans la mesure de l'activité tARN nucléotidyltransférase.

Après incubation 30 mn à 37° le tARN est précipité par du TCA dans des conditions identiques à celles employées lors du dosage de la tARN nucléotidyltransférase.

/ DOSAGE DES PROTEINES ET DES ACIDES NUCLEIQUES.

La concentration en protéines est déterminée par la mesure de l'absorption à 260 et 280 nm, en utilisant l'abaque de WARBURG et CHRISTIAN (64) ou par dosage selon la technique de LOWRY (65) en utilisant comme référence de la sérum albumine bovine.

La concentration en tARN est déterminée par mesure de l'absorption à 260 nm, en utilisant la relation : une absorption à 260 nm de 22 correspond à une solution de tARN à 1 mg / ml, dans un tampon Tris-HCl 10^{-2} M, pH 7,4, acétate de Mg^{++} 10^{-3}M, NaCl 10^{-1}M. (trajet optique 1 cm).

/ PREPARATION DES tARN SUBSTRATS.

Le tARN de levure commercial est capable d'accepter environ 0,30 mole d'AMP et 0,09 mole de CMP par mole de tARN. Il est utilisé tel quel pour toutes les mesures courantes de l'incorporation d'AMP.

Le tARN de E. coli commercial, par contre, n'accepte qu'environ 0,02 mole d'AMP par mole de tARN et pratiquement pas de CMP ; il doit donc être préalablement dégradé pour servir de substrat à la tARN nucléotidyltransférase, tant pour l'incorporation d'AMP que de CMP.

Pour cette dégradation deux techniques ont été utilisées.

1) Hydrolyse ménagée par la phosphodiestérase de venin de serpent.

Dans des conditions voisines de celles de MILLER et al. (66).

Le milieu d'incubation (1 ml) contient 50 µmoles de tampon glycinate de sodium, pH 8,7, 13 µmoles d'acétate de Mg^{++}, 10 mg de

tARN de coli et 0,6 mg de phosphodiestérase de venin de serpent (potentiel 0,3). Après incubation 1 heure à 37° on dépose l'échantillon sur une colonne de Sephadex G-25 (52 × 1 cm), recouverte d'une couche d'acide silicique d'environ 1 cm et équilibrée par de l'acétate de sodium 0,1 M (en acétate), pH 4,4. L'échantillon est précédé de 5 ml de tampon Tris-HCl 10^{-2}M, pH 7,3, acétate de Mg^{++} 10^{-3}M, NaCl 0,3 M. On élue avec du tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,4. Le pic de tARN est recueilli, puis on connecte la colonne de Sephadex à une colonne de Dowex AG 1 × 8 (200-400 mesh) (9,5 × 1 cm), équilibrée par le même tampon, pour analyser les nucléotides produits. Lorsque tout ce matériel a été adsorbé on lave la colonne de Dowex par 10 ml du même tampon, puis on établit un gradient (100 ml × 2) de 0,1 M à 2 M en acétate de sodium, pH 4,4 (débit 1 ml/mn) et on élève la température de la colonne de Dowex à 45°. On recueille d'abord les nucléosides puis le CMP. Lorsque le pic de CMP est sorti on coupe la communication entre les deux compartiments du gradient afin d'obtenir une meilleure résolution des pics d'UMP et d'AMP qui se recouvrent partiellement, puis on élue le GMP par l'acétate de sodium 2 M, pH 4,4. La détermination quantitative de la surface de chaque pic permet de calculer le degré d'hydrolyse. Cette détermination n'est valable que si le tARN a été préalablement repurifié selon la méthode utilisée par PHILIPPS (67), par filtration sur une colonne de Sephadex G-100 en tampon acétate d'ammonium 0,1 M pH 5,4 pour éliminer l'ARN 5S et des produits de poids moléculaire plus élevé ou plus faible qui représentent environ 35 % de la préparation commerciale.

Cette méthode fournit un substrat capable d'incorporer 0,57 mole de CMP / mole de tARN et 0,36 mole d'AMP / mole de tARN en présence de CTP. Cependant, la phosphodiestérase de venin étant contaminée par une endonucléase une certaine proportion des molécules présentent des coupures.

2) Dégradations récurrentes par le periodate.

Selon la technique de KHYM et UZIEL (68), par oxydation

periodique du ribose 3' terminal accompagnée de la β élimination de la base qu'il porte, catalysée par la lysine, suivie de l'enlèvement du phosphate 3' terminal résiduel par la phosphatase alcaline. Le tARN est traité sous forme de sel de céthyltriméthylammonium, soluble à forte force ionique et insoluble à faible force ionique, ce qui permet de récupérer le tARN entre les étapes par précipitation par simple dilution. Le sel de sodium du tARN est finalement régénéré par précipitation et lavage à l'éthanol-acétate Na (69). Le rendement de chaque cycle étant environ de 90 %, l'homogénéité du substrat décroît à chaque étape. Le tARN ainsi traité ne présente pas de coupures endonucléolytiques mais certaines bases fragiles peuvent être endommagées par le periodate. En particulier le thiouracile est détruit (70). Par ailleurs, cette technique conduit à l'enlèvement au moins partiel (71) du phosphate 5' terminal.

E / PREPARATION DE tARN MARQUES DANS L'EXTREMITE 3' TERMINALE.

Le mélange réactionnel est le même que pour le dosage de la tARN nucléotidyltransférase. On utilise suivant le cas du tARN de E. coli -pX ou -pXpCpC. L'activité spécifique très élevée des nucléotides utilisés oblige dans certains cas à abaisser leur concentration. Après une incubation de 3 heures en présence d'une forte quantité d'enzyme, la réaction est arrêtée par dilution du mélange réactionnel à 0,5 ml avec de l'acétate de Na 0,1 M, pH 4,0 et l'échantillon déposé sur une colonne de Sephadex G-25 (52 × 1 cm) surmontée d'une couche d'acide silicique de 1 cm environ équilibrée par ce même tampon. Le pic de tARN est recueilli et additionné de 2 volumes d'éthanol. Après 1 nuit à -20°, le précipité de tARN est collecté par centrifugation, séché, repris par de l'eau et dialysé contre de l'eau.

Analyse de ces produits.

Le tARN est hydrolysé par KOH 0,2 N pendant 1 nuit à 37°. L'hydrolysat est neutralisé par l'acide perchlorique et le précipité de perchlorate de potassium éliminé par centrifugation à froid. Les produits d'hydrolyse sont caractérisés par électrophorèse sur papier

Whatman n° 3 à 34 V par cm pendant 2 h dans un tampon citrate de Na 0,05 M, pH 3,6 en présence de marqueurs. Après localisation des différents nucléosides et nucléotides par observation en ultra-violet le papier est découpé en morceaux de 1/2 cm de largeur dont la radioactivité est mesurée dans du mélange scintillant toluène-diméthylPOPOP-PPO.

F / ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

1 - Gels normaux.

Des gels de polyacrylamide (0,6 × 6,5 cm), à 5 % ou 7,5 % d'acrylamide, à pH 9 sont préparés selon la technique de DAVIS (72). On dépose 10 à 20 µg de proteines par gel. L'électrophorèse a lieu pendant 75 mn, dans un tampon Tris 10^{-2}M, glycine 0,4 M, pH 8,3 avec une intensité de 4 mA par gel. Les proteines sont fixées et colorées par une solution de bleu de coomassie dans l'acide acétique à 7,5 %. L'excès de colorant est éliminé par diffusion en présence de Dowex AG 1 × 2.

Pour localiser l'activité enzymatique, des tranches de 2mm d'épaisseur sont découpées et incubées à 37° dans 250 µl de mélange réactionnel classique pour mesure de l'incorporation d'AMP, de CMP ou d'UMP. A la fin de l'incubation, on prélève 150 µl du surnageant que l'on dépose sur un morceau de papier Whatman n° 3 (2 × 4 cm) que l'on jette dans du TCA 5 % contenant 1,5 % d'ATP. Les papiers sont lavés 2 fois au TCA 5 %, 1 fois à l'alcool éthylique 66 %, 1 fois à l'alcool-éther (1:1) et 1 fois à l'éther, séchés et comptés dans du mélange scintillant.

2 - Gels en présence de SDS.

Ces gels sont réalisés selon la technique de SHAPIRO et al. (73).

G / CULTURE DE PHAGES T_4.

Le phage T_4 est cultivé sur souche de E. coli B Benzer, isolé et purifié selon les techniques classiques (74).

H / EXTRACTION DE L'ADN DU PHAGE T_4.

L'ADN est extrait au phénol et conservé dans du tampon Tris-HCl 10^{-2}M, pH 7,9, NaCl 10^{-3}M, EDTA 10^{-4}M stérile, à 4°.

I / TRANSCRIPTION IN VITRO DE L'ADN DU PHAGE T_4

Le milieu d'incubation renferme, dans un volume de 2 ml, 80 µmoles de Tris-HCl, pH 8,0, 20 µmoles de $MgCl_2$, 12 µmoles de βmercaptoéthanol, 200 nmoles d'EDTA, 100 µmoles de KCl, 2 µmoles d'ATP, de CTP, de GTP et d'UTP-α^{32}P, 25 µg d'ARN polymérase saturée en facteur σ, une quantité saturante (6 µg) de facteur ρ et 125 µg d'ADN de T_4. Après 1 heure d'incubation à 37° on ajoute 30 µg de DNAase pancréatique (sans RNAase) puis, après 5 mn, du SDS à la concentration finale de 3 pour 1 000. Après centrifugation à froid pour éliminer le SDS et les proteines dénaturées, l'échantillon est débarrassé des nucléotides par filtration sur une colonne de Sephadex G-25 (1 × 50 cm).

- II -

PURIFICATION DE L'ENZYME

A / ETAPES DE LA PURIFICATION

La purification a été généralement réalisée à partir de E. coli, souche MRE 600. Dans certains cas, la souche 20031 (extrait brut donné par le Dr. J.P. WALLER) a été utilisée.

1) Préparation de l'homogènat brut.

500 g d'Escherichia coli sont broyés dans un volume d'une solution de Tris-HCl 10^{-2}M, pH 7,9, $MgCl_2$ 10^{-2}M et EDTA 10^{-3}M (tampon A). On ajoute à ce mélange 1 kilogramme de billes de verre et on homogénéise dans un "Warring-Blendor" à -10° (NaCl-glace) pendant 40 minutes par périodes successives, de façon à maintenir la température autour de 4°C. L'homogénat est centrifugé à 14 000 g pendant 60 mn. Le volume de surnageant est amené à 1 litre avec du tampon A.

2) Précipitation à la streptomycine.

A 1 litre de surnageant, on ajoute 200 ml d'une solution fraichement préparée de sulfate de streptomycine à 10 %. L'addition est effectuée en 30 mn avec agitation constante. Le précipité contenant essentiellement les acides nucléiques est éliminé par centrifugation.

3) Précipitation à la protamine.

Pour 1 litre de surnageant de streptomycine on ajoute 200 ml d'une solution de sulfate de protamine à 1 %. L'opération est effectuée comme la précédente. Une fois la protamine ajoutée, le mélange est maintenu pendant la nuit à 4°. Plus de 90 % de l'activité de la tARN nucléotidyltransférase se retrouve dans le surnageant de protamine.

4) Précipitation au sulfate d'ammonium.

On ajoute au surnageant obtenu ci-dessus, du sulfate d'ammonium jusqu'à 80 % de saturation, afin d'éliminer la protamine. La précipitation est réalisée avec agitation constante à 0°. Le précipité contenant l'activité enzymatique est recueilli par centrifugation, puis dissous dans une solution de Tris-HCl 10^{-2}M, pH 7,9, $MgCl_2$ 10^{-2}M, EDTA 10^{-3}M et βmercaptoéthanol 10^{-2}M (tampon B) et dialysé contre ce même tampon. La solution enzymatique est alors amenée à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le surnageant est éliminé et le précipité dissous et dialysé contre du tampon B. Le volume final est de 30 ml.

5) Chromatographie sur DEAE-cellulose (voir figure 1 de l'article de B.B.A. (19)).

La solution dialysée est déposée sur une colonne de DEAE-cellulose (3 cm × 25 cm) équilibrée avec une solution de tampon Tris-HCl 2. 10^{-3}M, pH 8,5, $MgCl_2$ 10^{-2} M, et βmercaptoéthanol 10^{-2} M (tampon C). Après lavage, les proteines sont éluées avec du tampon C contenant du KCl aux molarités suivantes : 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 et 0,25 M. La majeure partie de l'activité se retrouve dans les éluats correspondant aux concentrations de KCl 0,10 et 0,15 M. Les fractions ayant l'activité spécifique la plus élevée sont concentrées par dialyse sous pression à travers une membrane Dyaflo UM-1, retenant les composés de poids moléculaire supérieur à 10 000. Dans plusieurs cas, le polyéthylèneglycol a été utilisé pour concentrer l'enzyme.

6) Filtration sur Sephadex G-200 (voir figure 2 de l'article de BBA) (19)

Une fraction de l'enzyme concentré après chromatographie sur DEAE-cellulose est déposée sur une colonne de Sephadex G-200 (2 cm × 110 cm) équilibrée avec du tampon C contenant du NaCl 0,1 M et éluée avec ce même tampon. Les fractions montrant l'activité spécifique la plus élevée sont concentrées par Dyaflo.

Le tableau 1 résume les étapes de purification décrites ci-dessus et montre qu'au cours de ces étapes, l'enzyme est purifié mille fois environ.

Pendant le cours de ce travail parut la technique de purification de la tARN nucléotidyltransférase de E. coli mise au point par MILLER et PHILLIPS (18 et 75). Cette technique a été essayée intégralement et donne, entre nos mains un enzyme d'un degré de pureté analogue à celui de l'enzyme obtenu par le procédé ci-dessus. Cependant certaines étapes utilisées par MILLER et PHILLIPS dans leur purification ont été retenues et intégrées par la suite à notre processus de purification. Il s'agit d'abord de l'addition, également faite par BEST et NOVELLI dans leur préparation (21), de glycérol 10 % à tous les tampons, ce qui semble stabiliser l'enzyme. Par ailleurs une chromatographie sur hydroxyapatite et une seconde DEAE-cellulose ont été ajoutées aux étapes de purification.

7) Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite.

Après la première DEAE, l'enzyme est directement adsorbé sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée par du tampon phosphate de Na 0,005 M, pH 7,4, acétate de Mg^{++} 10^{-2} M, βmercaptoéthanol 5. 10^{-3}M, glycérol 10 %. L'élution est faite par un tampon de même composition contenant du phosphate de Na aux concentrations 0,015 M puis 0,030 M, pH 7,4 (Figure 1). L'activité enzymatique sort assez tardivement, à 0,030 M en phosphate de Na.

8) Deuxième chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

Les fractions les plus actives de la colonne d'hydroxyapatite sont réunies et déposées sur une colonne (1,2 cm × 3,2 cm) de DEAE-cellulose équilibrée par du tampon Tris-HCl 10^{-2}M, pH 7,8, acétate de Mg^{++} 10^{-2} M, βmercaptoéthanol 5. 10^{-3} M, glycérol 10 %, puis l'enzyme est élué par un gradient de 0 à 0,4 M de NaCl dans ce même tampon. Etant donnée la force ionique due au phosphate de

Na présent dans la solution déposée et le pH de celle-ci, l'activité enzymatique sort à la fin du volume mort et au début du gradient, avant la plupart des proteines (Figure 2).

Etapes supplémentaires de purification.

9) Centrifugation en gradient de glycerol.

Dans certains cas, afin d'éliminer certains contaminants, notamment une ATPase et une pyrophosphate, l'extrait enzymatique a été centrifugé dans le rotor SW-41 pendant 24 heures, dans un gradient de 5 à 20 % de glycérol dans du tampon Tris-HCl 10^{-2} M, pH 8,5, βmercaptoéthanol 10^{-2} M, à la vitesse de 40 000 tours par minute.

10) Electrofocalisation.

L'électrofocalisation (76, 77) est réalisée dans l'appareil LKB 8101 avec la cathode au sommet. Une gamme de pH comprise entre 3 et 8 est utilisée. L'enzyme est déposé avec le tiers supérieur du gradient de saccharose et d'ampholines. L'électrophorèse dure 3 jours. L'activité enzymatique se trouve rassemblée en un pic étroit autour du point isoélectrique de l'enzyme que cette méthode permet de déterminer (figure 3). On trouve ainsi une valeur de 6,4. En raison de la faible quantité de proteines utilisées, de l'absorption des ampholines à 280 nm et de leur réaction au dosage de LOWRY, le profil des proteines dans le gradient n'a pu être déterminé.

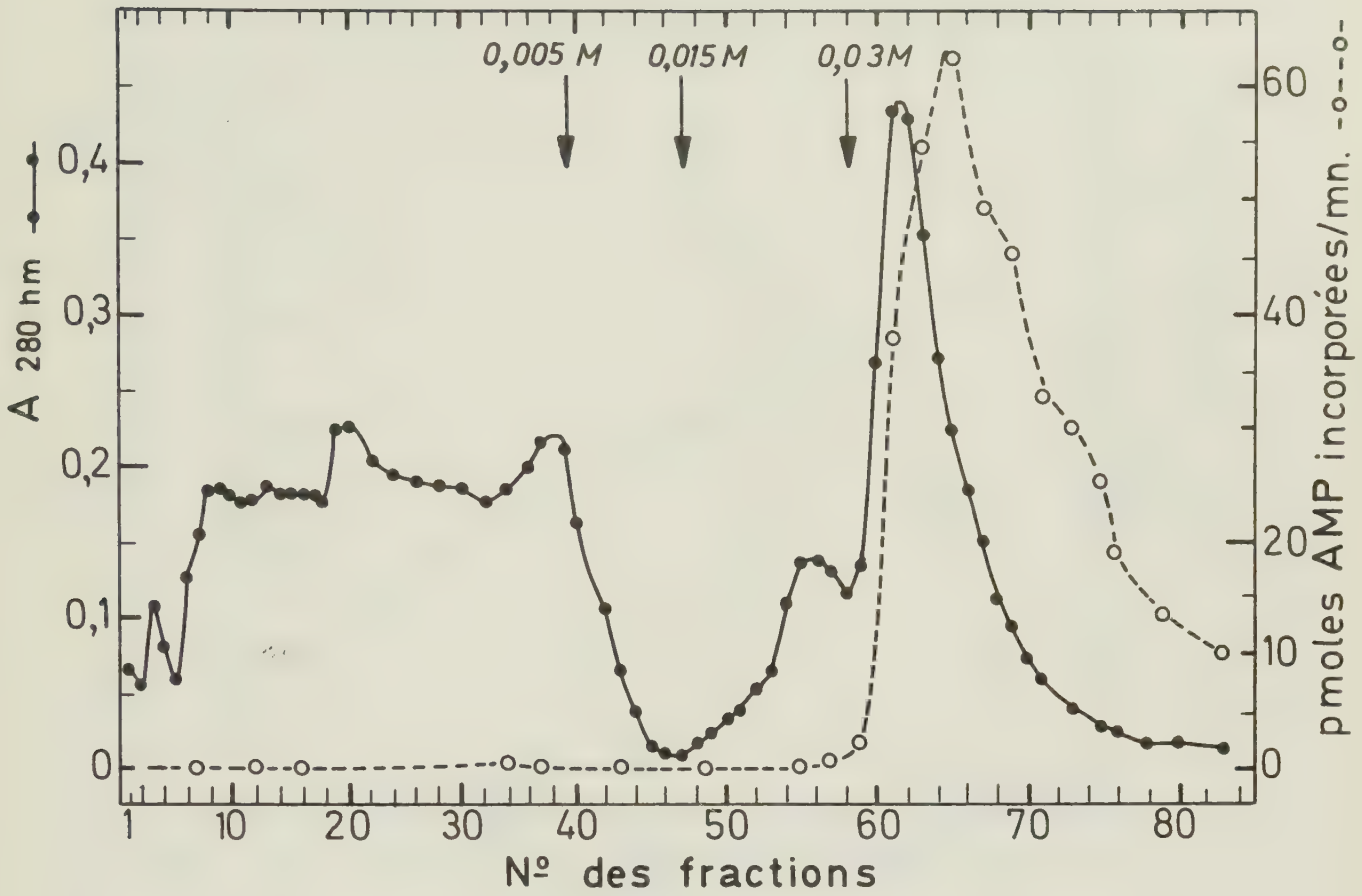


Figure 1 - Chromatographie sur hydroxyapatite de la tARN nucléotidyltransférase.

Le volume des fractions est de 3 ml, des aliquotes de 20 µl sont utilisées pour le test d'activité.

●——● $A_{280\ nm}$.

o ----- o pmoles d'AMP incorporées par minute.

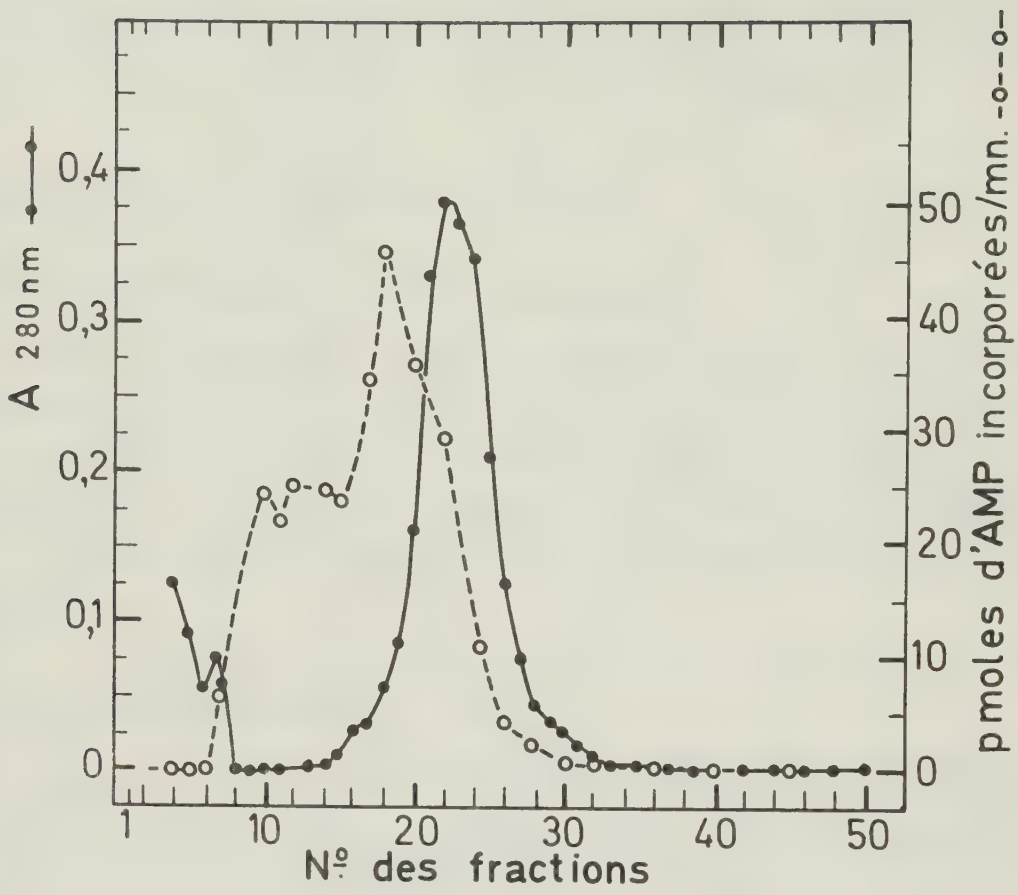


Figure 2 - Deuxième chromatographie sur DEAE-cellulose de la tARN nucléotidyltransférase.

Le volume des fractions est de 3 ml, on prélève des aliquotes de 20 µl pour la mesure de l'activité enzymatique.

—●———● $A_{280\ nm}$

o------o pmoles d'AMP incorporées par minute

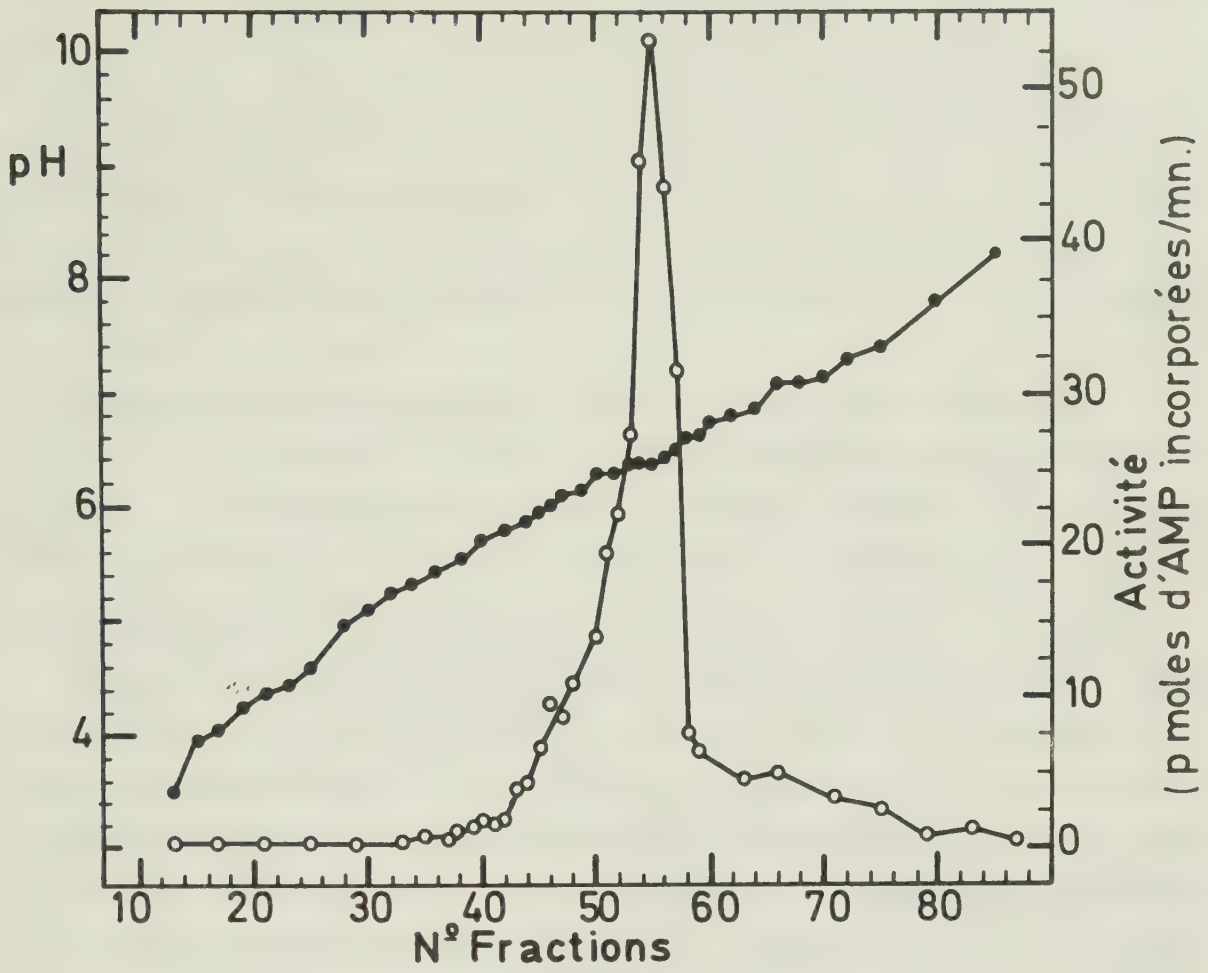


Figure 3 - Electrofocalisation de la tARN nucléotidyltransférase.

Le volume des fractions est de 1 ml, des aliquotes de 2 µl sont utilisées pour le test d'activité.

●——● pH.

o——o pmoles d'AMP incorporées par minute dans du tARN de levure.

B / BILAN DE LA PURIFICATION.

Les premières étapes de la purification sont résumées dans le tableau 1. Elles conduisent à l'obtention d'une préparation ayant une activité spécifique de 3 700 unités par mg de proteines, dépourvue des activités suivantes : RNA-polymérase, ribonucléase, aminoacyl-tARN synthétases, polynucléotide phosphorylase, poly A synthétase. Des traces d'une activité ATPasique restent présentes.

Les étapes suivantes ont été réalisées sur des extraits de E. coli semi-purifiés, qui nous ont été donnés par Dr. J.P. WALLER. Ces extraits étaient les fractions renfermant l'activité tARN nucléotidyltransférase d'une colonne de DEAE-cellulose réalisée après broyage des bactéries, précipitation des acides nucléiques à la streptomycine et fractionnement des proteines par précipitation entre 30 et 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Ils présentaient un degré de purification analogue à celui de la préparation ici décrite à l'étape DEAE-cellulose. Les étapes hydroxyapatite, DEAE-cellulose et électrofocalisation (Tableau 2) apportent une purification d'environ 300 fois par rapport à l'extrait reçu. Le facteur de purification total se trouve donc être d'environ 100 000.

La tARN nucléotidyltransférase est de moins en moins stable dans les dernières étapes de sa purification. On peut cependant la conserver plusieurs mois dans une solution à 50 % de glycérol dans du Tris-HCl 10^{-2}M, pH 8,5, βmercaptoéthanol 10^{-3} M, à -20°. Par contre à 4° elle perd totalement son activité en 2 ou 3 jours.

C / PURETE DE L'ENZYME

1 - Spectre d'absorption.

La préparation de tARN nucléotidyltransférase obtenue après électrofocalisation présente une absorption à 280 nm très faible par rapport à son contenu en "proteines" déterminé par dosage de

- Tableau 1 -

Fraction	Activité totale (unités) $\times 10^4$	Activité spécifique (unités/mg proteines)	Purification
Homogénat brut	8,0	3,3	1
Surnageant de streptomycine	39,0	21	6,3
Surnageant de protamine	57,0	30	9,1
$(NH_4)_2SO_4$ (0-40 %)	14,4	64	19,2
Eluats de DEAE-cellulose			
0,1 A	1,2	1350	366
0,1 B	0,6	1490	457
0,15	1,4	775	232
Sephadex G-200 (0,1 A)	0,89	3750	1130

- Tableau 2 -

Fraction	Activité totale (unités) $\times 10^4$	Activité spécifique (unités/mg proteines)	Purification
Eluat DEAE-cellulose (J.P.W.)	2000	2700	1
Hydroxyapatite	500	850	3,1
DEAE-cellulose	600	25300	9,4
Sephadex G-100 (sur une aliquote)		31000	11,5
Electrofocalisation (sur une aliquote)		1000000	370

Tableaux 1 et 2 - Purification de la tARN nucléotidyltransférase.

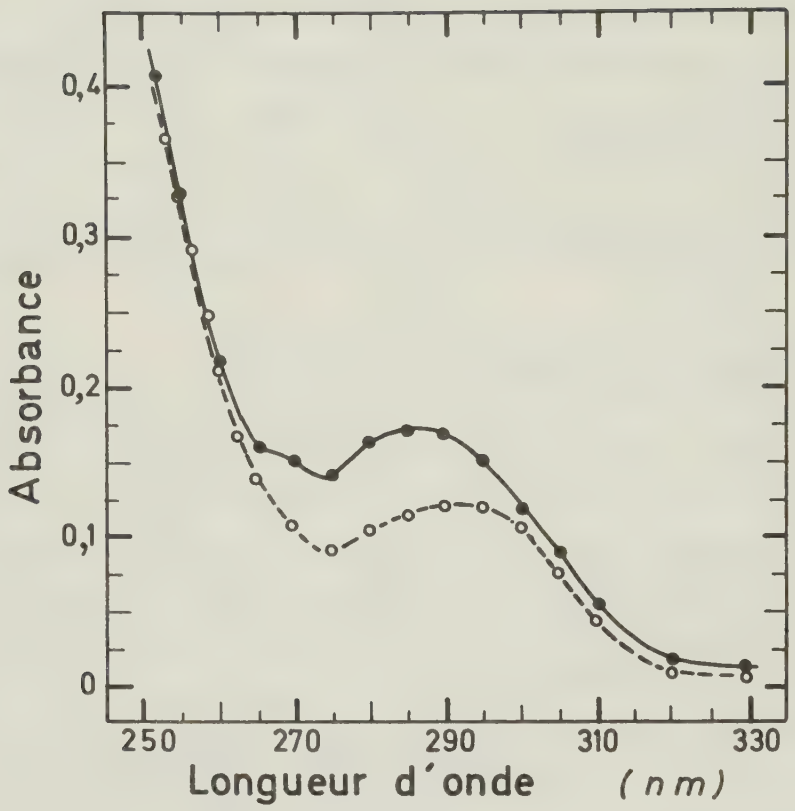


Figure 4 - Spectre de la tARN nucléotidyltransférase dans NaOH 0,2 N.

Les proteines sont précipitées par le PCA 10 % puis dissoutes dans NaOH 0,2 N. (2 fois)

●——● tARN nucléotidyltransférase purifiée par électrofocalisation (190 µg de proteines/ml)

o ---- o Sérum albumine bovine (170 µg/ml)

LOWRY (1 mg / ml donne une absorption de 0,14 à 280 nm). Ceci est dû à la présence de traces d'ampholines de haut poids moléculaire, difficiles à éliminer, qui réagissent à ce dosage. Le dosage est alors réalisé après élimination des ampholines par précipitation des proteines par l'acide perchlorique 10 % et dissolution du précipité dans NaOH 0,2 N. Un témoin de sérum albumine est traité dans les mêmes conditions. Le spectre d'absorption a été réalisé sur cette solution (figure 4). Dans ces conditions de pH, l'absorption de l'enzyme peut être estimée à $A_{280\ nm} = 0,9$ pour une solution à 1 mg / ml (trajet optique 1 cm).

2 - Activité spécifique et turn-over.

L'activité spécifique de la tARN nucléotidyltransférase après l'étape d'électrofocalisation est de 10^6 unités par mg de proteines. L'activité est déterminée dans les conditions standards, la concentration en proteines après élimination des ampholines.

Dans ces conditions l'ATP est facteur limitant. A une concentration égale à 3 fois le K_M l'activité est de 1,8 10^6 pmoles d'AMP incorporées par minute par mg de proteines. Il lui correspond, si l'on admet un poids moléculaire de 40 000, un turn-over de 70 moles d'AMP incorporées dans du tARN de levure par minute par mole d'enzyme.

3 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Sur gel de polyacrylamide normal cette préparation enzymatique présente 2 bandes principales et une bande mineure (Figure 5). Les deux bandes principales possèdent l'activité enzymatique. La moins intense des deux, de rf 0,30 dans les gels à 7,5 % d'acrylamide, se retrouve dans toutes les préparations enzymatiques quel qu'en soit le degré de pureté. Elle possède les activités d'incorporation d'AMP et de CMP. Elle a également été identifiée par le fait qu'elle suit l'activité tARN nucléotidyltransférase lors de l'isolement par centrifugation en gradient de glycerol du

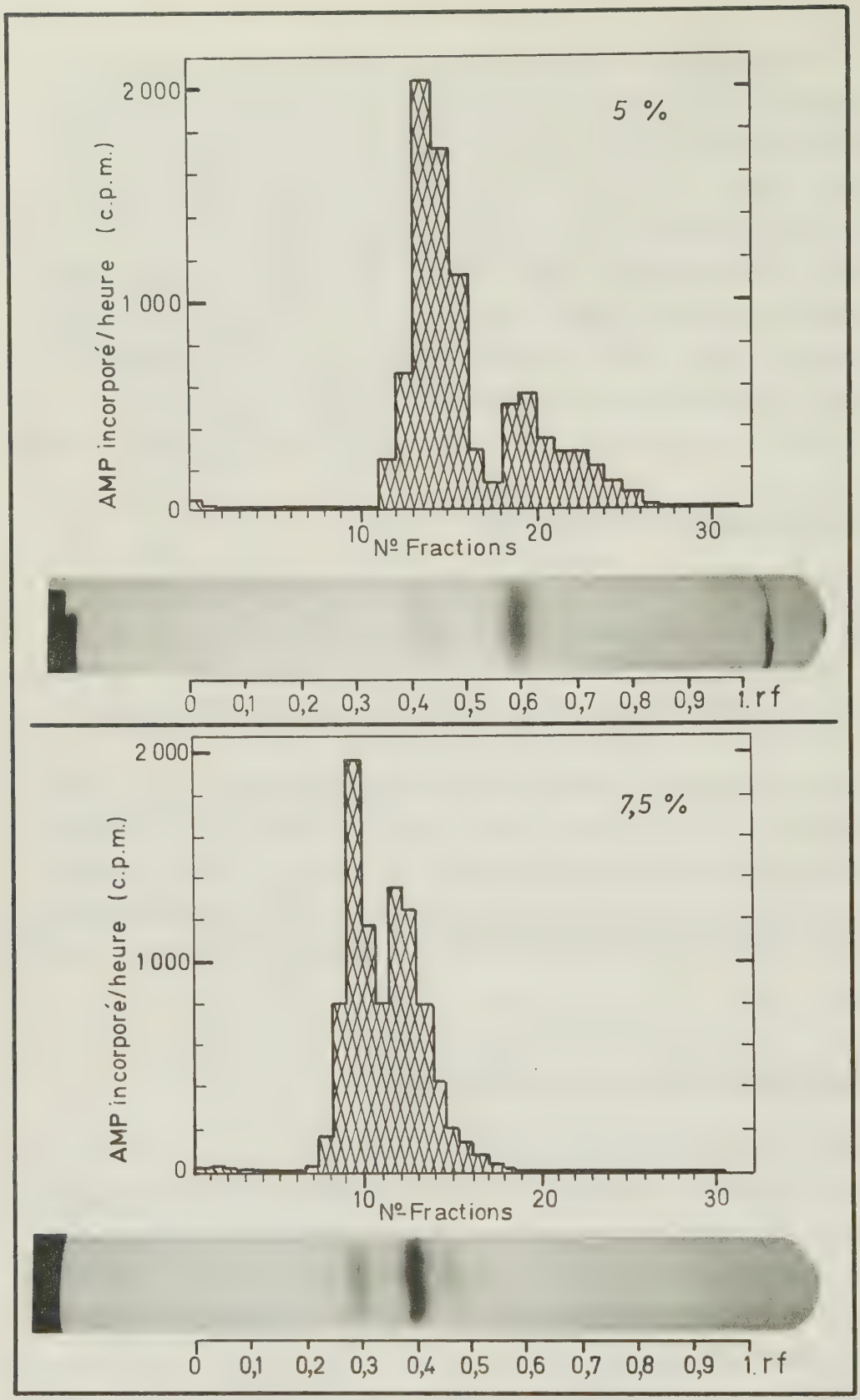


Figure 5 - Electrophorèse sur gels de polyacrymamide sans SDS de la tARN nucléotidyltransférase.

Gels à 5 et 7,5 % d'acrylamide.
Technique décrite dans le chapitre Méthodes.

complexe enzyme-tARN. La seconde bande (rf 0,40), n'est pas présente dans toutes les préparations enzymatiques. Il ne peut s'agir d'une relation monomère-dimère car la migration de ces bandes dans des gels de diverses porosités (5 à 10,5 % d'acrylamide) correspond à celle de proteines de poids moléculaires peu différents (78). Il s'agit vraisemblablement d'une proteolyse partielle de l'enzyme donnant naissance à un produit présentant encore de l'activité.

Par électrophorèse en présence de SDS, la préparation analysée ci-dessus présente également 3 bandes et une zone colorée diffuse due à la présence des ampholines. La seconde en intensité, correspond à une proteine de poids moléculaire 40 000 environ (migration identique à celle de la phosphatase alcaline).

CONCLUSION

Purifié 100 000 fois environ, la tARN nucléotidyltransférase présente trois bandes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide normal. Ceci peut correspondre à des formes proteolysées conservant ou non l'activité enzymatique.

Cette enzyme possède une activité spécifique de 10^6 unités/mg de proteines, supérieure à celle des préparations de BEST et NOVELLI (21) (600 000 unités par mg) et de MILLER et PHILLIPS (75) (480 000 unités par mg) évaluées dans des conditions plus favorables.

Le turn-over de la tARN nucléotidyltransférase dans nos conditions (70 par minute) est d'un ordre de grandeur analogue à celui d'autres enzymes de polymérisation de nucléotides comme l'ARN polymérase ou l'ADN polymérase, bien que dans le cas de la tARN nucléotidyltransférase, l'enzyme doive se détacher de son substrat polynucléotidique à chaque addition d'un AMP.

D / CARACTERISATION DE L'ENZYME.

1 - Poids moléculaire.

Le poids moléculaire a été déterminé par centrifugation en gradient de saccharose, par rapport à l'hémoglobine de lapin (S = 4,2 S). La constante de sédimentation est de 3,4 S, ce qui correspond, par application de la formule de MARTIN et AMES (79) $S_1 / S_2 = (M_1 / M_2)^{2/3}$ à un poids moléculaire de 45 000 $\pm$ 3 000 daltons (moyenne de 4 déterminations).

L'ultracentrifugation analytique* d'un échantillon incomplètement purifié mais homogène par cette technique, a donné une valeur de 2,9 S à laquelle on peut faire correspondre un poids moléculaire de 36 000 daltons (en supposant une conformation globulaire).

Par filtration sur colonne de Sephadex G-100 étalonnée à l'aide de diverses proteines, nous avons trouvé une valeur de 37 000 daltons (19).

Aucune dissociation en sous-unités n'a pu être détectée par filtration de l'enzyme sur colonne de Sephadex G-100 en présence d'urée 8 M.

D'autres auteurs rapportent des valeurs de 45 000 (75) et 42 000 (20) par filtration sur Sephadex, et 54 000 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (75).

Les enzymes des eucaryotes ont des poids moléculaires plus élevés : 50 000 à 80 000 pour la levure suivant la technique utilisée (22-24) et 48 000 pour l'enzyme de foie de lapin (80), mais ne renferment pas non plus de sous-unités.

---

* L'ultracentrifugation analytique a été réalisée par le Dr. ARNAUD, CEN Saclay.

2 - Point isoélectrique.

La technique d'électrofocalisation décrite dans la purification de l'enzyme a été utilisée. La valeur du point isoélectrique est de 6,4.

- III -

ETUDE DE LA SPECIFICITE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE

A / SPECIFICITE A L'EGARD DES NUCLEOTIDES

Si les réactions principales catalysées par la tARN nucléotidyltransférase sont celles qui conduisent à la synthèse du triplet 3' terminal des tARN, ce ne sont pas les seules dont cet enzyme soit capable. En effet, dans des conditions particulières de concentration en nucléotides et en ions, on peut observer l'incorporation de nucléotides conduisant à la synthèse de séquences "anormales" non observées dans les tARN naturels.

1) Nature des nucléotides incorporés.

Le dATP, le GTP, l'AMPPCP ne sont pas substrats de la tARN nucléotidyltransférase du moins dans les conditions standards.

Par contre, AMP, CMP et UMP peuvent être incorporés (à partir des nucléosides triphosphate correspondants) et ce, en diverses positions dans le tARN.

2) Incorporation de ces nucléotides dans des tARN de divers degrés de dégradation.

La figure 5 bis montre les cinétiques d'incorporation d'AMP, de CMP et d'UMP dans des tARN totaux de E. coli dépourvus à leur extrémité 3'OH d'un, deux, trois ou quatre nucléotides, préparés par cycles successifs d'oxydation periodique.

On constate que l'AMP s'incorpore préférentiellement dans le $tARN_{-1}$, mais également à un taux notable dans les $tARN_{-2}$ et $_{-3}$, donnant ainsi naissance outre à la séquence normale -pXpCpCpA, aux séquences anormales -pXpCpA (ou $-pXpC(pA)_n$) et -pXpA (ou $-pX(pA)_n$). Il ne s'incorpore par contre pratiquement pas dans le $tARN_{-4}$ et le $tARN_o$, montrant que le tARN commercial de E.coli

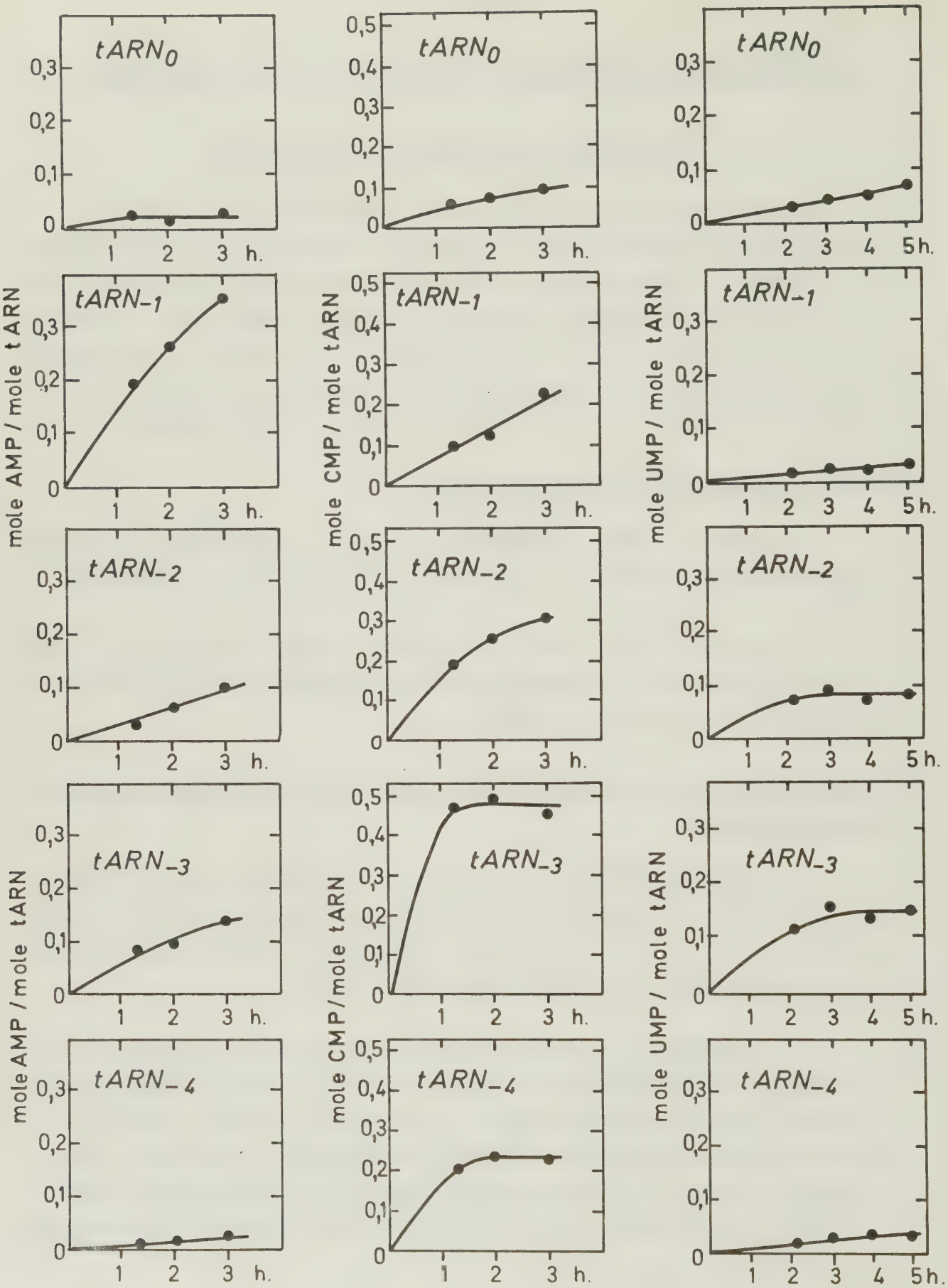


Figure 5 bis - Incorporation de divers nucléotides dans des tARN de E. coli préparés par oxydation periodique.

tARN de E. coli traité à la phosphodiestérase de venin de serpent	
Nucléotides utilisés	Incorporation (mole de nucléotide/mole de tARN)
1 - *ATP	0,34
2 - *ATP + CTP	0,36
3 - *CTP	0,65
4 - *UTP	0,54
5 - CTP ... ... + *ATP	0,17
6 - ATP ... ... + *CTP	0,13

tARN de E. coli préparé par oxydations periodiques successives.				
tARN	*ATP	*ATP + CTP	*CTP + ATP	*UTP
	Incorp. (mole de nucléotide / mole tARN)			
$tARN_{-1}$	0,43	0,48	0,14	
$tARN_{-2}$	0,41°	0,39	0,47	0,38
$tARN_{-3}$	0,51°	0,37	0,66	0,53

Tableau 3 - Taux d'incorporation de divers nucléotides dans du tARN de E. coli traité par la phosphodiestérase du venin ou par le periodate.

Le nucléotide marqué est indiqué par *.
Dans les expériences 5 et 6, l'addition du nucléotide marqué est faite lorsque l'incorporation de l'autre nucléotide a atteint son maximum.

° Ces valeurs sont mesurées par défaut (plateau non atteint).

utilisé ici possède quasi totalement une séquence finale complète -pXpCpCpA.

Le CMP s'incorpore le plus, comme on pouvait le prévoir, dans les $tARN_{-2}$ et $_{-3}$, mais on constate également une incorporation importante dans le $tARN_{-1}$, ce qui représente une incorporation surnuméraire de CMP donnant naissance à la séquence -pXpCpCpC (ou $-pXpCpC(pC)_n$). Il y a également incorporation de CMP dans le $tARN_{-4}$. Ceci peut être le résultat d'un enlèvement incomplet des nucléotides à chaque cycle d'oxydation periodique ayant pour conséquence la présence d'une proportion non négligeable de tARN à séquence finale -pX dans le $tARN_{-4}$. Il pourrait également s'agir d'une véritable incorporation anormale de CMP en position -4.

L'incorporation d'UMP, très faible dans les $tARN_{-1}$ et $_{-4}$ est maximum dans les $tARN_{-2}$ et $_{-3}$. Elle est aussi non négligeable dans le $tARN_{o}$. Le taux et la vitesse de ces incorporations est dans tous les cas assez faible.

Dans les cas où le palier de la réaction a été atteint on constate que les incorporations sont loin d'être stoechiométriques. Les tARN préparés par action de la phosphodiestérase de venin ne sont pas de meilleurs substrats (tableau 3). Ceci est un phénomène général décrit également par d'autres auteurs. Il est dû, tout d'abord, à la présence dans le tARN commercial d'ARN inactifs, matériel étranger ou tARN associés ou dénaturés. En particulier, dans notre cas, la filtration sur colonne de Sephadex G-100 selon la technique de PHILLIPS (67), met en évidence 35 % de matériel plus lourd que le tARN, à faible activité acceptrice. Il peut en outre y avoir inactivation des tARN au cours des traitements nécessaires à l'enlèvement des 3 nucléotides terminaux. On constate que la capacité d'incorporation d'AMP en présence de CTP décroît au cours des cycles successifs d'oxydation par le periodate. La nature de cette inactivation n'est pas très claire. Il a été montré que cette technique endommage certaines bases,

notamment le thiouracile (Alain FAVRE, communication personnelle), ce qui peut entrainer l'inactivation de certains tARN. Cependant, la même inactivation est observée avec le tARN de levure qui ne renferme pas de thiouracile (61). Ce n'est donc pas la cause générale. La phosphodiestérase de venin de serpent ne dégrade pas les molécules de tARN de manière synchrone. Elle produit des mixtures de tARN dont l'extrémité 3' terminale est plus ou moins dégradée. Les molécules dégradées au-delà du 3ème nucléotide sont inactives. De plus, certaines préparations de phosphodiestérase de venin sont contaminées par une endonucléase dont l'activité est extrèmement visible sur l'ARN de TYMV dont la structure secondaire globale est moindre que celle des tARN. Il est par ailleurs possible que les traitements subis par les tARN les laissent dans une conformation telle qu'ils sont inactifs vis à vis de la tARN nucléotidyltransférase. Différents essais pour augmenter le taux d'incorporation ont été infructueux (81).

Le tableau 3 montre, d'autre part, que la préincubation du tARN-pX avec le CTP seul, en présence de tARN nucléotidyltransférase, réduit la capacité d'incorporation ultérieure d'AMP. De même, la préincubation du tARN-pX avec l'ATP réduit la capacité d'incorporation de CMP. Le tARN-pXpA ou -pXpCpA ainsi formé n'étant pas substrat pour l'incorporation de CMP. Ce n'est donc qu'en présence d'ATP et de CTP que l'on obtient la synthèse de la séquence normale -pCpCpA. La réalité physiologique de cette synthèse a été démontrée par la restauration de l'aptitude à incorporer des acides aminés après traitement de tARN-pX par la tARN nucléotidyltransférase en présence d'ATP et de CTP (tableau 4).

3) Séquences formées

Afin d'étudier plus précisément les séquences formées dans les divers cas nous avons fait l'hydrolyse alcaline du produit d'incorporation et l'analyse par électrophorèse des nucléotides et nucléosides libérés.

Le tableau 5 résume ces résultats.

tARN utilisé	Incorporation d'acides aminés (nmoles par mg de tARN)	%
tARN de E. coli non traité	13,8	100
tARN de E. coli-pX	0,09	0,6
tARN de E. coli -pX(pCpCpA)	11,2	81

Tableau 4 - Effet de l'enlèvement et de la remise de la séquence 3' terminale pCpCpA des tARN sur les taux de charge par 14 acides aminés

Le tARN de E. coli -pX a été préparé par action de la phosphodiestérase de venin dans les conditions décrites dans le chapitre Méthodes.

La séquence 3' terminale -pCpCpA a été restaurée dans les conditions suivantes : volume réactionnel de 1,5 ml renfermant : Tris-HCl, pH 8,5, acétate de Mg et βmercaptoéthanol aux concentrations standards, 300 nmoles d'ATP et de CTP, 338 µg de tARN et 240 unités de tARN nucléotidyltransférase. Incubation 3 heures à 37°, précipitation par l'éthanol en présence d'acétate de K. Le précipité est repris et dialysé extensivement contre du tampon Tris-HCl 10^{-2} M, pH 8,5, acétate de Mg 10^{-3}M.

L'aminoacylation est réalisée avec des aliquotes de 30 à 37 µg de tARN dans les conditions décrites dans le chapitre Méthodes avec une préparation brute d'aminoacyltARN synthétases (125 µg de proteines).

Substrat	Nucléotide utilisé	Produits de l'hydrolyse alcaline		Séquences formées % du nb total de molécules	
tARN-pXpCpC	ATP*	AMP = 10,4 % Adenosine = 83,5 % Adenine = 6,4 %	89,9 %	-pXpCpCpA -pXpCpCpApA	88,5 % 11,5 %
tARN-pX	ATP*	AMP = 1,5 % Adenosine = 85,1 % Adenine = 13,3 %	98,4 %	-pXpA -pXpApA	98,4 % 1,5 %
tARN-pXpC	CTP*	CMP = 37,9 % UMP = 0,5 % Cytidine = 58,5 % Cytosine = 3,0 %	38,4 % 61,5 %	-pXpCpC -pXpCpCpC	37,5 % 62,5 %
tARN-pX	CTP*	CMP = 51,9 % UMP = 1,0 % Cytidine = 44,6 % Cytosine = 2,5 %	52,9 % 47,1 %	-pXpCpC -pXpCpCpC	87,8 % 12,3 %
tARN-pX	UTP*	UMP = 2,8 % Uridine + Uracile = 97,0 % Adenosine = 2,0 %	(a)	-pXpU -pXpUpU	97,1 % 2,9 %
tARN-pXpU*	CTP	UMP = 33,0 % Uridine + Uracile = 67,0 %		-pXpU -pXpUpC	67,0 % 33,0 %
tARN-pXpC	UTP*	UMP = 3,9 % Uridine + Uracile = 96,0 %		-pXpCpU -pXpCpUpU	96,0 % 3,9 %
tARN-pXpCpU*	ATP	UMP = 0,5 % Uridine + Uracile = 99,5 %		-pXpCpU -pXpCpUpA	99,5% 0,5 %

Tableau 5 - Détermination des séquences synthétisées par la tARN nucléotidyltransférase.

Les tARN sont préparés et analysés comme il est décrit dans le chapitre Méthodes.

(a) Les pourcentages ont été calculés par rapport à la radioactivité totale des dérivés de l'UTP.

* indique le nucléotide tritié.

a) Incorporation d'AMP* dans le tARN -pXpCpC.

Elle se produit essentiellement en position terminale. La séquence formée est donc normalement -pXpCpCpA. A l'AMP libéré correspond 11,5 % de séquences anormales -pXpCpCpApA (ou un pourcentage plus faible de séquences renfermant plusieurs AMP successifs.

b) Incorporation d'AMP* dans le tARN -pX.

Il s'incorpore également en position terminale. La fréquence d'incorporation successive de 2 AMP est plus faible que dans le cas précédent. On a donc essentiellement formation de la séquence -pXpA.

c) Incorporation de CMP* dans le tARN -pXpC.

En l'absence d'ATP il y a incorporation d'au moins 1 CMP surnuméraire conduisant à la synthèse de séquences -pXpCpCpC ou -pXpCpC$(pC)_n$. En supposant que cette addition de CMP excédentaires ne dépasse pas 1 unité, on a, dans le cas décrit, 62,5 % de séquences -pXpCpCpC.

d) Incorporation de CMP* dans le tARN -pX.

Dans le tARN -pX on constate la synthèse des mêmes types de séquences. En effet, on obtient ici (avec la même hypothèse que ci-dessus) 12,3 % de séquences -pXpCpCpC (en négligeant dans le calcul d'éventuelles séquences incomplètes -pXpC). La proportion de séquences anormales plus faible indique que, probablement, la réaction n'a pas atteint son maximum.

e) Incorporation d'UMP* dans le tARN -pX.

L'analyse par électrophorèse de l'hydrolysat alcalin de ce tARN fournit essentiellement de l'uridine. Il ne se produit que très peu (2,9 %) d'incorporations successives de deux UMP, contrairement à ce qui se passe avec le CTP. On a donc synthèse

de la séquence -pXpU et des traces de séquences -pXpUpU (ou -pXpU$(pU)_n$). Un très faible pic d'adenosine est dû à la présence d'ATP (2,2 %) contaminant la préparation d'UTP marqué.

f) Incorporation de CMP dans le tARN -pXpU*.

Après incubation du produit précédent avec du CTP non radioactif, les deux tiers de la radioactivité se retrouvent sous forme d'UMP. Ceci veut dire qu'il y eu incorporation de CMP en position terminale après un UMP et que l'on a synthétisé la séquence -pXpUpC (ou -pXpUpC $(pC)_n$).

g) Incorporation d'UMP* dans le tARN -pXpC.

Dans ce cas également l'UMP est incorporé en position terminale, donnant la séquence -pXpCpU et seulement 3,9 % de séquences -pXpCpUpU.

h) Incorporation d'AMP dans le tARN -pXpCpU*

Après incubation de ce produit avec de l'ATP la radioactivité est toujours sous forme d'uridine, c'est-à-dire qu'il n'y a pas incorporation d'AMP après un UMP. Il n'y a pas formation de la séquence -pXpCpUpA.

Donc l'UMP s'incorpore à la place de l'un ou l'autre CMP, mais il n'y a jamais (< 4 %) 2 UMP consécutifs et cette incorporation ne peut être suivie de celle d'un AMP. Le cas de séquences -pXpUpCpA n'a pas été examiné.

4) Vitesse d'incorporation des divers nucléotides.

Les vitesses d'incorporation des divers nucléotides sont fort différentes ; les incorporations anormales étant toujours beaucoup plus lentes comme le montre le tableau 6.

Nucléotide	tARN	ions divalents	Vitesse (%)
ATP 10^{-4}M	coli-pXpCpC	Mg^{++} 10^{-2}M	100
ATP 10^{-4}M	coli-pX	Mg^{++} 10^{-2}M	3,76
CTP 10^{-4}M	coli-pXpC	Mg^{++} 10^{-2}M	66,4
CTP 10^{-4}M	coli-pX	Mg^{++} 10^{-2}M	39,3
UTP 10^{-4}M	coli-pX	Mg^{++} 10^{-2}M	1,46
UTP 10^{-4}M	coli-pX	Mg^{++} 10^{-2}M, Mn^{++} 5 10^{-4}M	2,81

Tableau 6 - Vitesse d'incorporation de divers nucléotides

La vitesse a été déterminée dans les conditions standards mises à part les modifications indiquées dans le tableau. Le tARN est en excès (au moins 100 µg par essai). Les vitesses sont exprimées en pourcentage par rapport à la vitesse d'incorporation d'AMP en conditions normales. Celle-ci est de 10^6 pmoles d'AMP incorporées par minute par mg de tARN nucléotidyltransférase.

Ces mesures ont été réalisées dans les conditions standards. Les différences de vitesse reflètent autant des différences de V_{Max} que de K_M à l'égard des différents nucléotides.

5) Réaction de pyrophosphorolyse.

La réaction de pyrophosphorolyse, inverse de la réaction d'addition des nucléotides, est très faible. Elle nécessite de très fortes concentrations en pyrophosphate.

DISCUSSION.

De très nombreux cas d'incorporation anormale de nucléotides catalysée par la tARN nucléotidyltransférase ont été décrits, surtout en ce qui concerne les enzymes d'eucaryotes (24, 27 et 81 - 85). Ces incorporations se produisent toujours avec une vitesse moindre que les incorporations normales (82). Elles sont généralement inhibées par la présence des substrats normaux. C'est le cas de l'incorporation d'AMP dans le tARN -pXpC pour former la séquence -pXpCpA qui en présence de CTP est inhibée au profit de la synthèse de la séquence -pXpCpCpA, ou de l'incorporation d'UMP dans tous les substrats, inhibée rapidement par la présence de CTP (parfois même plus que ne le laisserait supposer les K_M relatifs de l'enzyme à l'égard de ces deux substrats. (75). Si certaines ont lieu même à faible concentration en enzyme (synthèse de la séquence -pXpCpA et incorporation d'UMP), d'autres incorporations ne se manifestent qu'avec de fortes concentrations en enzyme. Dans ces conditions, toutes les possibilités existent comme le montrent les données obtenues par DEUTSCHER avec l'enzyme de foie de lapin : incorporation d'AMP, de CMP et d'UMP dans le tARN-pXpCpCpA, synthèse de séquences oligo C ou $-(C)_nA$ etc .. (82). Ces synthèses anormales sont stimulées par la présence de Mn^{++} au lieu de Mg^{++} (82 et 86), comme c'est le cas dans nos expériences, pour l'incorporation d'UMP, mais non pour l'incorporation anormale d'AMP dans le tARN-pX. On voit que la spécificité de l'enzyme, même extrèmement purifié, n'est étroite qu'en présence de CTP et d'ATP dans des concentrations en rapport avec leurs K_M et avec un rapport $\frac{\text{tARN}}{\text{enzyme}}$ élevé.

Chez E. coli, les synthèses de séquences anormales ont été moins systématiquement étudiées et il existe certaines contradictions entre les observations. FURTH et col. (17), avec un enzyme peu purifié, n'observaient pas d'incorporation d'UMP, par contre, comme dans notre cas, celle-ci a été obtenue par BEST et NOVELLI (87) et MILLER et PHILLIPS (75). L'incorporation d'AMP dans le tARN -pXpC a été observée par ces deux groupes ainsi que

l'incorporation de plus de deux CMP. Cependant, MILLER et PHILLIPS rapportent que ces incorporations anormales, observées avec des préparations enzymatiques incomplètement purifiées, disparaissent après la dernière étape de purification. Notre préparation de tARN nucléotidyltransférase, d'activité spécifique supérieure à la leur, ainsi que celle de BEST et NOVELLI, identique, conservent néanmoins cette propriété. Il faudrait envisager une modification de l'enzyme, perte d'un facteur ou protéolyse partielle, intervenue à la dernière étape de leur purification, restreignant la spécificité de la tARN nucléotidyltransférase.

L'activité biologique de certains de ces tARN anormaux, obtenus par action de la tARN nucléotidyltransférase a été étudiée. Certains, comme le $tARN^{Phe}$ de levure de séquence terminale -pXpCpCpCpA peuvent être aminoacylés (88), d'autres comme le tARN -pXpCpA ne peuvent l'être (84). Ceci fait de la tARN nucléotidyltransférase, un instrument utile pour l'étude du rôle de l'extrémité 3' terminale des tARN dans leur reconnaissance par les aminoacyl tARN synthétases et leur utilisation au niveau des ribosomes.

Dans les tARN naturels on ne détecte pas de séquences du type de celles que nous obtenons ici, -pXpCpA ou -pXpCpU par exemple. Ces incorporations de nucléotides n'ont donc pas lieu <u>in vivo</u>. Ceci peut s'expliquer, d'abord, par la présence simultanée dans la cellule, d'ATP et de CTP à des concentrations qui favorisent largement la synthèse de la séquence normale et à un rapport de concentrations entre CTP et UTP tel que l'incorporation de ce dernier est pratiquement nulle. Par ailleurs, il n'est pas impossible que des modifications de l'enzyme au cours de sa purification puissent altérer sa spécificité.

B / EFFET DU pH ET DES IONS

1 - EFFET DU pH.

Comme c'est le cas pour toutes les tARN nucléotidyltransférases étudiées, quelle qu'en soit l'origine, le pH optimum de l'enzyme de E. coli pour l'incorporation d'AMP est très élevé : 9,5. L'activité aux pH 7-7,5, voisins du pH cellulaire, n'est que 10 à 20 % de cette valeur. (Figure 6).

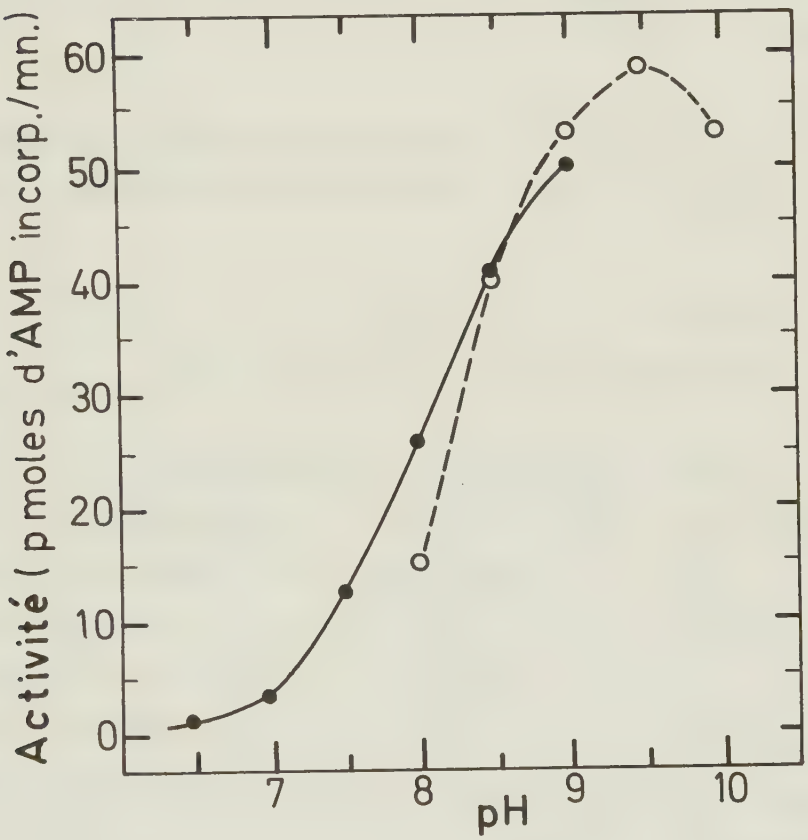


Figure 6 - Effet du pH sur l'incorporation d'AMP dans le tARN de levure.
Tampon : 50 mM.
—●—● Tampon Tris-HCl.
-o--o- Tampon 2-amino-2-méthyl 1,3-propanediol - HCl

2 - EFFET DES IONS.

1) Effet des métaux divalents.

L'activité enzymatique de la tARN nucléotidyltransférase nécessite la présence de métaux divalents. Même en l'absence de traitement par l'EDTA, les ions déjà présents dans le tARN ne suffisent pas pour permettre la réaction enzymatique, alors que, comme nous le verrons plus loin, le complexe avec le tARN peut se faire, même si le tARN a été au préalable dialysé contre de l'EDTA. BEST et NOVELLI (21), pour leur part, n'observent un besoin absolu en métaux divalents qu'après traitement de leur tARN par l'EDTA. Ceci reflète peut-être une richesse plus grande en Mg^{++} de leur préparation de tARN.

La nature et la concentration des ions utilisés modifient la vitesse des réactions mais non le taux final d'incorporation de nucléotides.

L'effet du Mg^{++}, du Mn^{++} et du Co^{++} sur les diverses activités d'incorporation est rapporté dans les figures 7a à 7d.

Le Mg^{++} est l'ion le plus efficace en ce qui concerne l'incorporation d'AMP et de CMP. Sa concentration optimale est de 1. 10^{-2}M pour l'incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpC, elle est un peu plus forte (2. 10^{-2}M) pour l'incorporation d'AMP dans le tARN-pX et présente un palier au-delà de 10^{-2}M pour l'incorporation de CMP dans le tARN-pX. On peut remarquer que la concentration optimale en Mg^{++} est largement supérieure à celle des nucléotides utilisés et également à celle du tARN (exprimée en nucléotides). Elle ne varie pas lorsque la concentration en ATP utilisée varie d'un facteur 10 (10^{-4}M ou 10^{-3}M), ni quand la concentration en tARN varie d'un facteur 2 (20 ou 40 μM). Elle ne dépend pas, par ailleurs de la nature du tARN, le tARN de levure non traité donnant les mêmes résultats que le tARN de E. coli -pXpCpC (préparé par oxydation periodique).

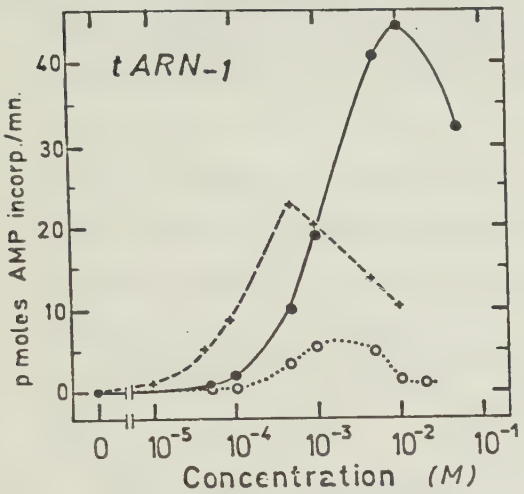


Figure 7a

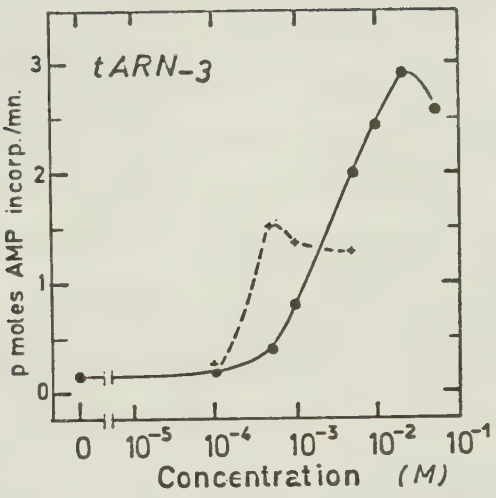


Figure 7b

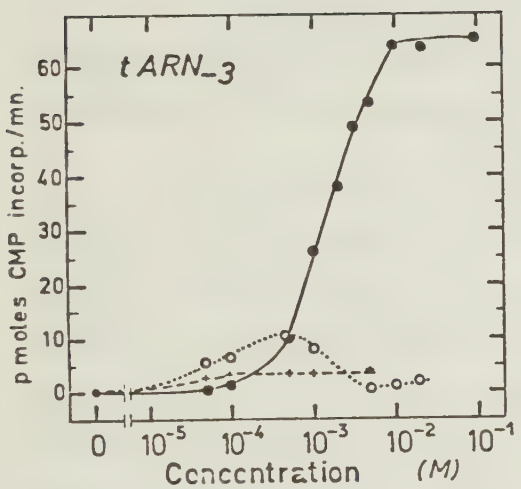


Figure 7c

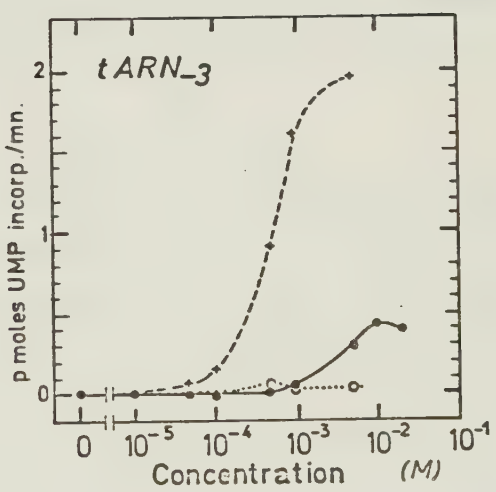


Figure 7d

Figures 7a à 7d - Effet de la concentration en cations divalents sur l'activité d'incorporation de divers nucléotides.

●——● $MgCl_2$.

\+ ---- + $MnCl_2$.

o -----o $CoCl_2$.

Figure 7a - Incorporation d'AMP dans du tARN de levure (-1).

45 unités d'enzyme par essai.

Figure 7b - Incorporation d'AMP dans du tARN de E. coli - 3

L'expérience a été faite avec 168 unités d'enzyme par essai et les résultats rapportés à 45 unités pour permettre la comparaison.

Figure 7c - Incorporation de CMP dans du tARN de E. coli - 3

45 unités d'enzyme par essai.

Figure 7 d - Incorporation dans du tARN de E. coli -3

L'expérience a été faite avec 225 unités d'enzyme par essai et les résultats rapportés à 45 unités pour permettre la comparaison.

L'ion Mn^{++} peut remplacer l'ion Mg^{++} dans une certaine mesure dans ces deux cas : plus efficace que celui-ci à basse concentration, il est inhibiteur plus tôt et ne permet pas d'atteindre la même activité maximum. La concentration optimale se situe vers $5.\ 10^{-4}$M et l'activité maximum atteinte, par rapport à celle obtenue avec le Mg^{++} est de 51 % pour l'incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpC et le tARN-pX. Par contre, elle ne dépasse pas 4 à 5 % dans le cas de l'incorporation de CMP. Ceci est différent du cas de la tARN nucléotidyltransférase de foie de lapin (89) où le Mn^{++} peut remplacer le Mg^{++} à 50 % de son activité dans tous les cas. Avec l'enzyme de foie de rat, KLEMPERER et HAYNES (86), ont constaté que le Mn^{++} était moins efficace que le Mg^{++} à faible force ionique mais plus efficace à forte force ionique.

En ce qui concerne l'incorporation d'UMP, la vitesse d'incorporation est 3 à 4 fois plus grande en présence de Mn^{++} que de Mg^{++}.

L'ion Co^{++} stimule légèrement l'activité d'incorporation d'AMP, de CMP et d'UMP (vitesses maximums 13 %, 16 % et 18 % de celles obtenues avec le Mg^{++}), la concentration optimale étant autour de 10^{-3}M.

En présence de Mg^{++} à sa concentration optimale (10^{-2}M), le Mn^{++} est inhibiteur en ce qui concerne le CTP et, à un moindre degré, l'ATP, comme le montre la figure 8, la vitesse d'incorporation du CMP est diminuée de 50 % avec une concentration en Mn^{++} de 10^{-4}M, soit 100 fois plus faible que celle de Mg^{++}. Ceci est à relier à la très faible activité de l'ion Mn^{++} seul pour l'incorporation de CMP et révèle une affinité des groupes nécessaires à l'incorporation de CMP plus grande pour le Mn^{++} que pour le Mg^{++}. Une stimulation de l'incorporation d'AMP dans ces conditions, comme cela se présente dans la figure 5 de l'article de Biochim. Biophys. Acta (19), a pu être observée dans des cas où le

βmercaptoéthanol était très limitant. La vitesse d'incorporation d'UMP est, contrairement à la vitesse d'incorporation de CMP, très stimulée par l'addition de Mn^{++} en présence de Mg^{++} 10^{-2}M. Cette stimulation est, pour toutes les concentrations, supérieure à l'addition des effets du Mg^{++} et du Mn^{++} seuls.

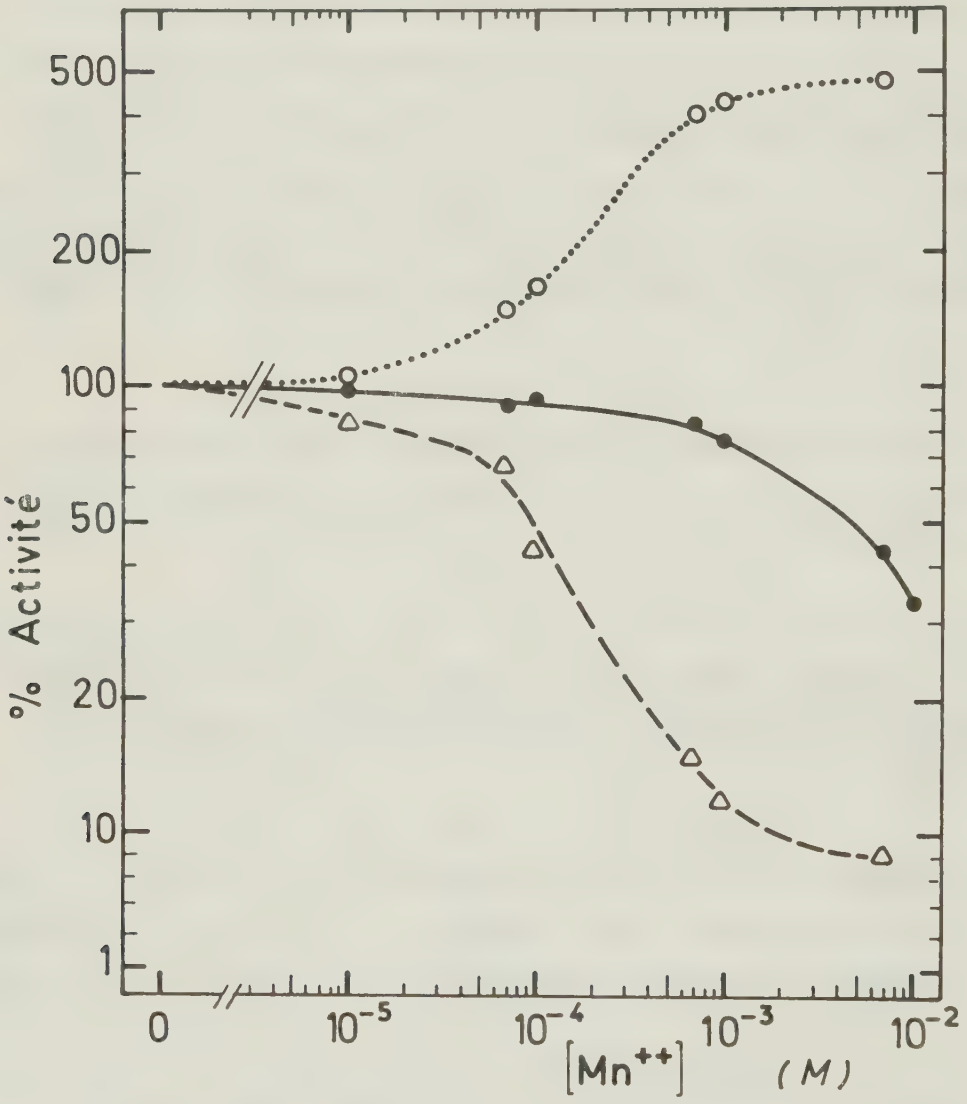


Figure 8 - Effet de la concentration en Mn^{++} sur l'activité d'incorporation de divers nucléotides en présence de Mg^{++} 10^{-2}M.

AMP dans tARN de levure (-1).
CMP dans tARN de E. coli -3
UMP dans tARN de E. coli -3

L'effet d'autres ions en présence de Mg^{++} $10^{-2}M$ a été étudié : Le tableau 7 donne l'inhibition de l'activité d'incorporation d'AMP obtenue par addition de divers cations à une concentration voisine de $5.\ 10^{-4}M$ en présence de Mg^{++} $10^{-2}M$.

Ions	% inhibition
$CuCl_2$	5
$MgCl_2$	10
$CaCl_2$	18
$CrCl_2$	23
$CoCl_2$	45
$ZnCl_2$	73

Tableau 7 - Effet de divers cations divalents en présence de Mg^{++} $10^{-2}M$ sur l'activité de la tARN nucléotidyltransférase.

L'activité est mesurée par la vitesse d'incorporation d'AMP dans du tARN de levure.

Concentration en Mg^{++} (Cl^-) $10^{-2}M$.
Concentration en EDTA $3{,}75\ 10^{-4}M$.
Concentration en cation divalent (sous forme chlorure) $7{,}5\ 10^{-4}M$.

2) Effet des amines

Ni la spermine, ni la spermidine aux concentrations $10^{-4}M$, $10^{-3}M$ et $10^{-2}M$, ne peuvent remplacer le Mg^{++} pour l'activité de la tARN nucléotidyltransférase comme c'est le cas pour certaines aminoacyl-tARN synthétases.

3) Effet des autres ions.

L'effet du KCl varie suivant la nature du nucléotide incorporé (figure 9). On observe une inhibition importante (50 % d'inhibition pour 0,1 à 0,15 M KCl), identique pour l'incorporation d'AMP en position normale et en position anormale et pour l'incorporation d'UMP dans le tARNpX. Par contre l'incorporation de CMP dans ce même tARNpX est stimulée par des concentrations en KCl inférieures à 0,17 M et inhibée au-delà. L'incorporation de CMP dans du tARNpXpC présente une stimulation analogue mais la phase d'inhibition est plus précoce (optimum à 0,075 M en KCl).

C'est probablement cette différence de comportement de l'activité d'incorporation du CMP qui explique que, dans le cas de ce nucléotide, l'acétate de magnésium, aux concentrations supérieures à 10^{-2}M, n'est pas inhibiteur.

Suivant la concentration en KCl dans le milieu, le rapport de l'activité de la tARN nucléotidyltransférase relative à l'incorporation d'AMP ou de CMP peut varier (d'un facteur 5 entre 0 et 0,3 M KCl).

Bien que faisant intervenir le même tARNpX comme substrat, l'incorporation de CMP et d'UMP ne met pas en jeu les mêmes interactions ioniques. Cette différence ne provient pas du fait que dans un cas l'enzyme ajoute successivement deux nucléotides (CMP) et dans l'autre un seul (UMP) car les courbes obtenues pour le CMP avec le tARNpX (addition de deux nucléotides) ou -pXpC (addition d'un seul) présentent toutes deux le même effet de stimulation.

L'ion Na^+ a le même effet que l'ion K^+ sur l'incorporation normale d'AMP et l'anion SO_4^{--} est plus inhibiteur que l'ion Cl^- (figure 6 de l'article de BBA (19)). L'activité inhibitrice de l'ion

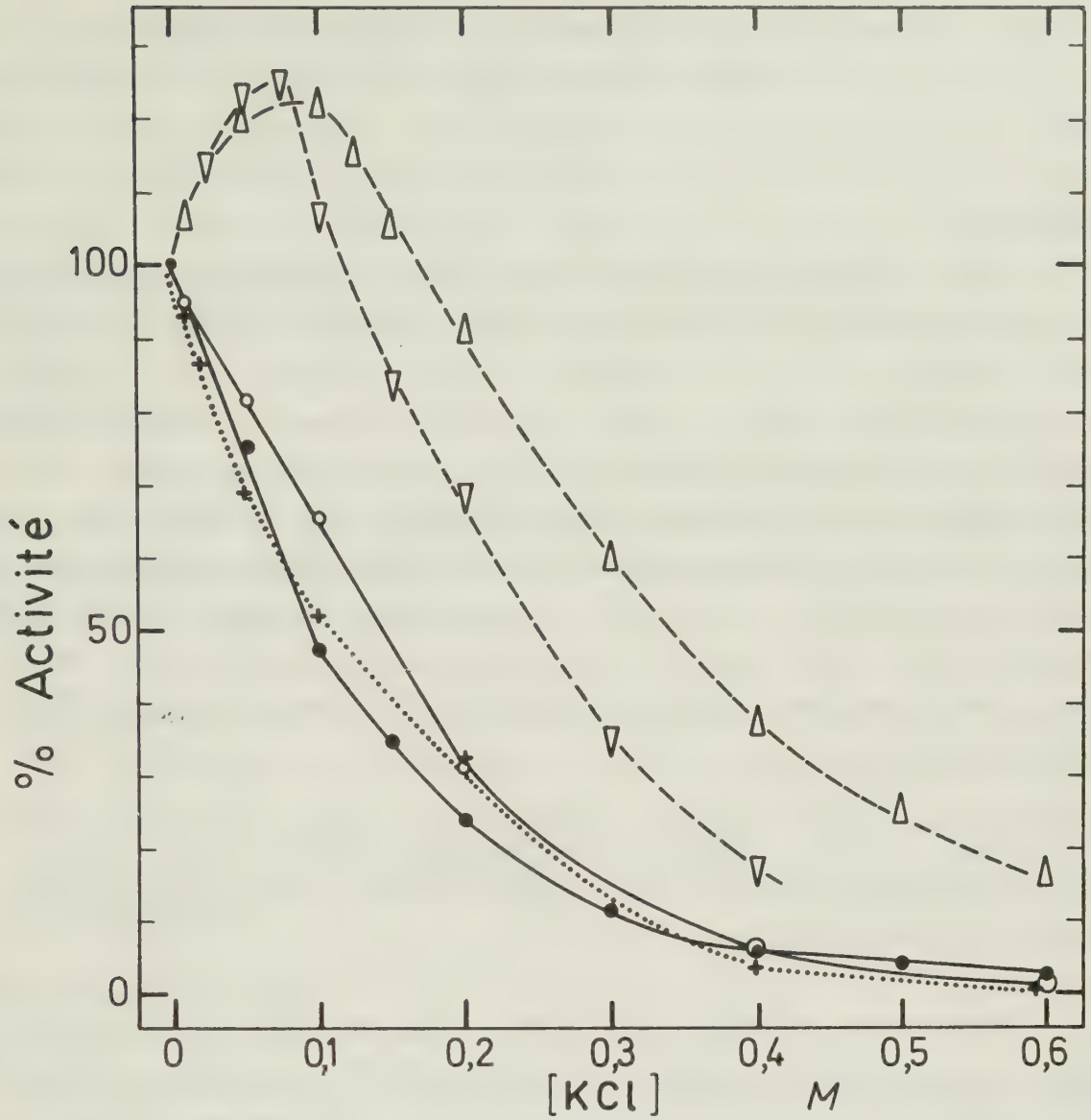


Figure 9 - Effet de la concentration en KCl sur l'activité d'incorporation de divers nucléotides.

●——● AMP dans tARN de levure (-1).

o —— o AMP dans tARN de E. coli -3.

\+ ---- + UMP dans tARN de E. coli -3.

Δ ---- Δ CMP dans tARN de E. coli -3.

▽ ---- ▽ CMP dans tARN de E. coli -2.

phosphate est analogue à celle de l'ion sulfate (phosphate de Na 0,1 M 87 % d'inhibition et sulfate de Na 0,1 M 81 % d'inhibition.

CONCLUSION

Les diverses activités de la tARN nucléotidyltransférase ont un comportement très différent sous l'effet des ions. D'une manière générale, on peut constater que les effets sont les mêmes pour un nucléotide donné, quelle que soit la position dans laquelle il est incorporé dans le tARN. Il semble donc que les ions divalents et monovalents interviennent au niveau des nucléotides (différentes formes de complexes salins des nucléosides triphosphates) et (ou) au niveau de leurs interactions avec l'enzyme. C'est peut-être aussi par le rôle qu'ils jouent dans la structure des tARN, que ces ions favorisent l'incorporation d'un nucléotide plutôt que d'un autre.

Mn^{++} et Mg^{++} semblent avoir, dans certains cas, un point d'action différent comme le fait penser leur action synergique sur l'incorporation d'UMP.

Quant au phénomène lié à la concentration en βmercaptoéthanol qui peut faire varier l'effet du Mn^{++} en présence de Mg^{++} sur la vitesse d'incorporation d'AMP il est encore inexpliqué, mais à rapprocher du fait que cette activité d'incorporation est très sensible aux agents réducteurs et aux réactifs des SH.

C / SPECIFICITE A L'EGARD DU SUBSTRAT POLYNUCLEOTIDIQUE

La tARN nucléotidyltransférase de E. coli reconnaît indistinctement tous les tARN de E. coli comme le montre la bonne restauration de la capacité de charge d'un tARN-pX après incubation avec cet enzyme en présence de CTP et d'ATP. Elle est également indifférente à l'origine du tARN.

Nous avons recherché les limites de la spécificité de cet enzyme en introduisant des modifications dans la structure des tARN et en recherchant dans d'autres ARN des structures susceptibles d'être reconnues par la tARN nucléotidyltransférase. Un cas particulièrement intéressant est celui de l'ARN du virus de la mosaique jaune du navet qui, bien que d'un poids moléculaire de $2\ 10^6$ est utilisé comme un tARN par la tARN nucléotidyltransférase et d'autres enzymes du métabolisme des acides nucléiques.

/ tARN MODIFIES

Diverses modifications de tARN et leurs effets sur l'activité de la tARN nucléotidyltransférase à l'égard de ces tARN ont été décrites (20, 90, 91). Nous nous sommes limités à l'étude de deux types de modifications :

1) Des déformations de la structure secondaire des tARN résultant de l'intercalation de composés polycycliques entre les bases.
2) La formation de liaisons covalentes transversales à l'intérieur des molécules de tARN établies par l'action du formol ou par l'irradiation.

/ Effet des colorants.

Les amines polycycliques sont connues pour se fixer sur les acides nucléiques et déformer leur structure secondaire. Nous avons étudié l'effet de l'acridine et du bromure d'éthidium sur l'utilisation du tARN comme substrat par la tARN nucléotidyltransférase.

α) Action du chlorhydrate de proflavine.

La fixation de ce colorant aux acides nucléiques par intercalation entre les bases a été étudiée (92-94), ainsi que l'effet inhibiteur de cette réaction sur l'aptitude des tARN à être aminoacylés (95, 96) ainsi qu'à être déacylés par la peptidylhydrolase (97). La figure 10 a montre l'effet de concentrations

croissantes de réactif. On observe un palier d'inhibition à 50 % de la vitesse initiale d'incorporation d'AMP. Cette inhibition n'est pas la conséquence d'une réaction du colorant au niveau de la tARN nucléotidyltransférase, car le pourcentage d'inhibition reste constant quand la quantité d'enzyme varie (figure 10 b). L'inhibition est le résultat d'une modification de la conformation du tARN due à la fixation du colorant. Aux fortes concentrations en proflavine il apparaît des phénomènes secondaires (précipitation).

β) Action du bromhydrate d'éthidium.

Les interactions du tARN de E. coli et du bromure d'éthidium ont été étudiées par BITTMAN (98), qui suggère l'existence de plusieurs sortes de complexes entre tARN et colorant. L'étude de l'activité de la tARN nucléotidyltransférase en fonction de la concentration en bromure d'éthidium (figure 11) a montré l'existence de deux types d'inhibition. Le premier phénomène (jusqu'à 50 % d'inhibition environ) serait dû à la fixation du BET sur le tARN par intercalation entre les bases. Il est observé pour des rapports de concentration $\frac{\text{BET total}}{\text{tARN}}$ de 1 à 3. L'inhibition est quantitativement la même que celle observée avec la proflavine. Le second phénomène pourrait correspondre à la fixation du colorant sur les groupes phosphates. Cette inhibition peut aller jusqu'à 100 %. Le taux d'incorporation d'AMP dans le tARN (figure 11) est peu affecté par le premier phénomène ; il décroît au cours de la seconde phase. Une diminution de 50 % de sa valeur est obtenue avec un rapport $\frac{\text{BET total}}{\text{tARN}}$ d'environ 1 mole de colorant par mole de nucléotides.

CONCLUSION

La vitesse de réaction de la tARN nucléotidyltransférase est affectée par les modifications de la structure secondaire des tARN entrainées par l'intercalation entre les bases d'une ou deux molécules de composés cycliques. Le taux de la réaction n'est que peu modifié dans les mêmes conditions. Il décroît par contre lorsque le rapport $\frac{\text{colorant}}{\text{tARN}}$ augmente et que des effets secondaires apparaissent.

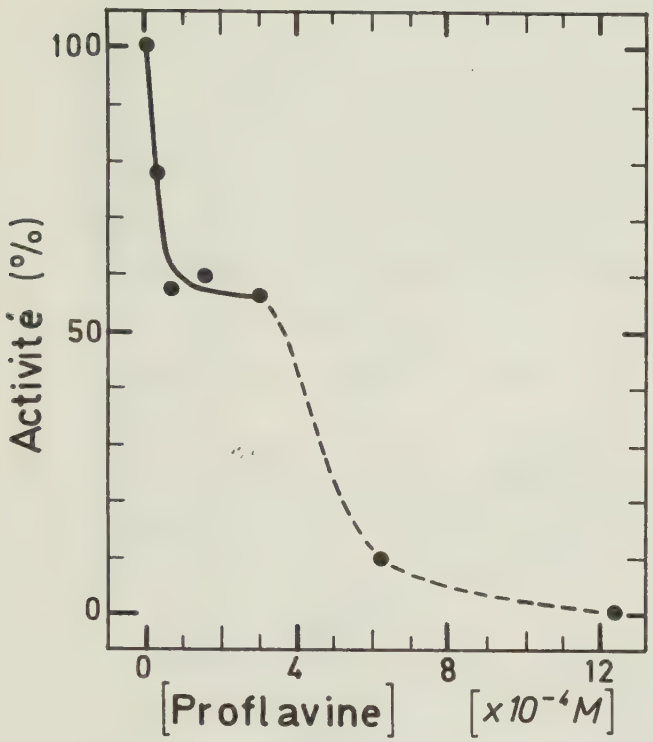


Figure 10 a

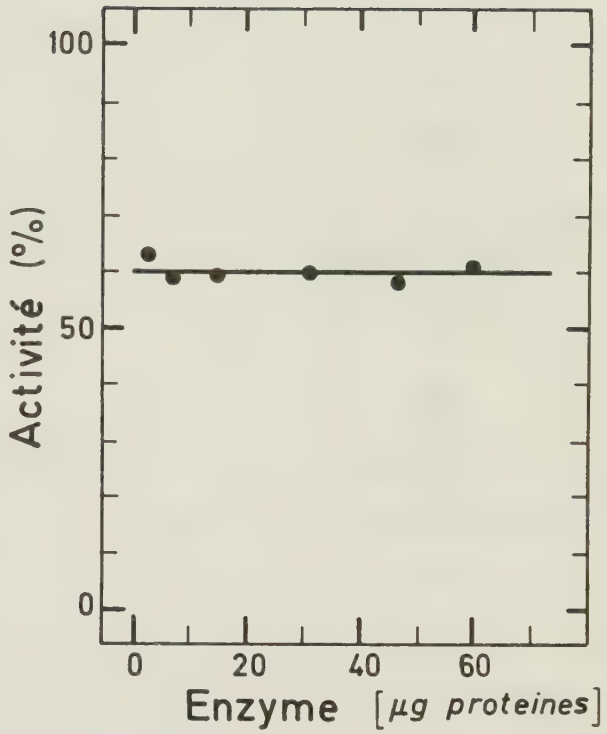


Figure 10 b

Figure 10 a - Effet de la concentration en proflavine sur la vitesse d'incorporation d'AMP dans le tARN de levure

Mélange réactionnel standard renfermant 5 nmoles de tARN de levure et de la proflavine aux concentrations indiquées.

Figure 10 b - Effet de la quantité de tARN nucléotidyltransférase sur l'inhibition par la proflavine.

Même mélange réactionnel, proflavine 1,2 10^{-4}M. L'activité en présence de proflavine est rapportée à l'activité de la même quantité d'enzyme en l'absence de colorant.

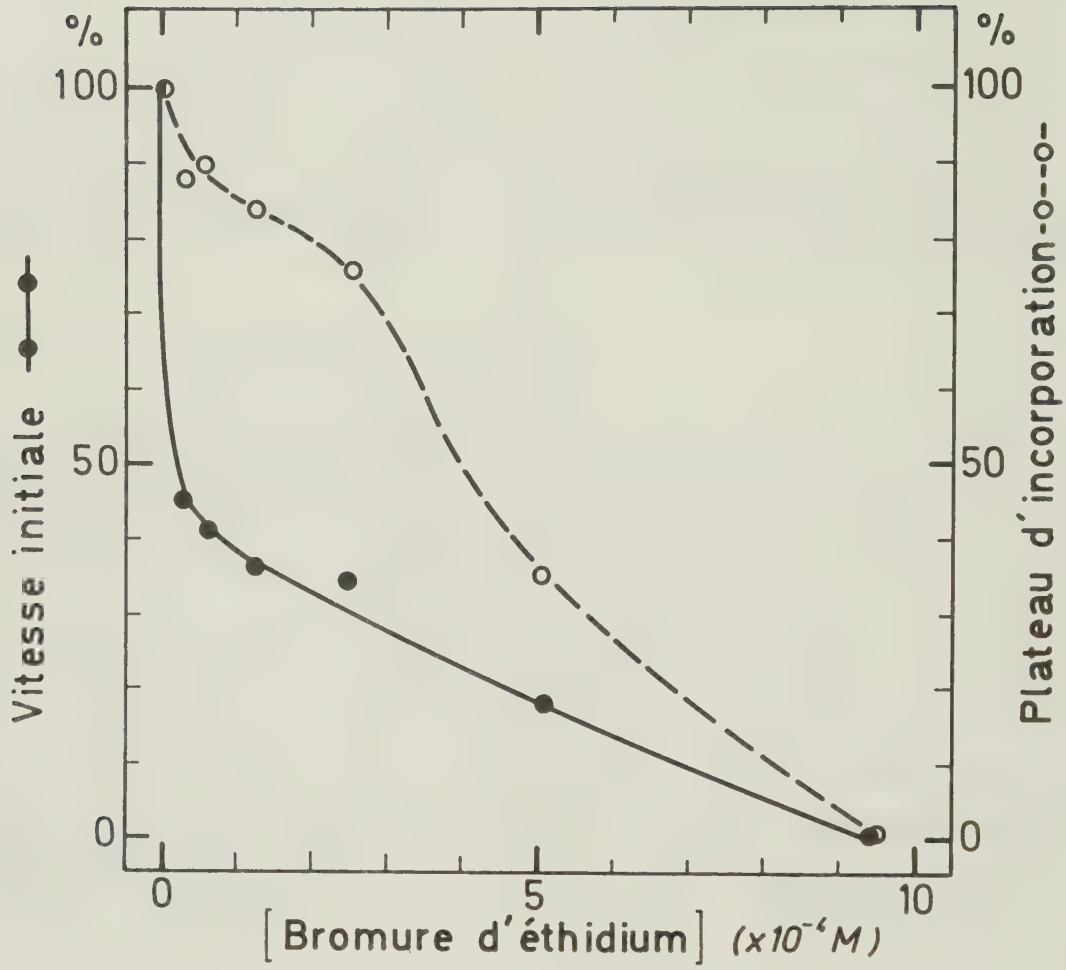


Figure 11 - Effet du bromure d'éthidium sur l'incorporation d'AMP

La réaction d'incorporation d'AMP est réalisée dans les conditions standards. tARN de levure 1,3 nmoles par essai. L'enzyme (50 unités) est ajouté en dernier.

●——● Effet sur la vitesse initiale de la réaction.

o----o Effet sur le taux d'incorporation

b / Formation de liaisons covalentes dans la molécule de tARN

α) Action du formol

FELDMAN (99) a montré que le formol peut réagir avec les fonctions amines des purines pour donner, après formation d'un dérivé R NH- CH_2OH un dimère du type R NH - CH_2 - NH R'. Cette réaction, très lente, se produit également avec les ARN, conduisant à la formation de liaisons covalentes essentiellement intramoléculaires. Avec du tARN, en présence de Mg^{++}, à 20° et à pH 4,8, au bout de 15 jours, la réaction affecte en moyenne 1 paire de bases par molécule de tARN. Ces liaisons sont essentiellement transversales. Le taux de charge de tARN ainsi traitée est de 23 à 66 %, selon l'acide aminé, de celui du tARN non traité (100).

Nous avons constaté que du tARN de levure, traité par le formol dans ces conditions, dont la capacité d'aminoacylation par un mélange de 14 acides aminés est réduite à une valeur comparable à celles observées par AXELROD et al. (100), est un substrat normal de la tARN nucléotidyltransférase pour l'incorporation d'ATP. Cette différence aurait pu être un artefact dû au fait que, si la charge porte sur toutes les molécules de tARN (en présence d'un extrait enzymatique brut et d'ATP), l'activité de la tARN nucléotidyltransférase ne s'effectue que sur celles qui sont dépourvues du résidu adenosyl terminal. Si la formation de ponts méthylène affecte préférentiellement ce résidu les tARN qui en sont dépourvus seront normaux. Afin de déterminer si l'adénosine terminale participe à la formation de ces liaisons covalentes nous avons traité un tARN de E. coli -pXpCpCp^{3}H-A par du ^{14}C-formol dans des conditions identiques et analysé par électrophorèse et chromatographie (solvant II selon FELDMAN) les produits de l'hydrolyse alcaline de ce tARN. Le nucléotide tritié se retrouve principalement sous forme d'adénosine libre (> 72 %). La différence de comportement de la tARN nucléotidyltransférase et des aminoacyl-tARN synthétases à l'égard du tARN ainsi ponté est fonction des exigences

supérieures de ces derniers enzymes en ce qui concerne la structure secondaire du tARN.

β) Effet de la formation d'une liaison covalente entre 4tU (8) et C (13).

L'irradiation du tARN à 335 nm conduit à la formation quantitative d'une liaison covalente entre le 4 thiouracile en position 8 et la cytosine en position 13 des tARN qui possèdent ces bases (101-103). Dans les autres cas le thiouracile est détruit par l'irradiation. La formation de ce pont entraine une rigidification de la structure du tARN et rend impossibles certaines transconformations.

Il a été montré (104-106) que cette réaction diminue l'affinité des aminoacyltARN synthétases pour les tARN ainsi modifiés mais permet néanmoins une aminoacylation totale. En outre l'aminoacyltARN formé est utilisé in vitro pour la synthèse proteique mais à une vitesse moindre que le tARN normal.

Il est intéressant pour caractériser les interactions des tARN avec les enzymes de leur métabolisme de savoir si l'activité d'un enzyme à spécificité moins étroite que les aminacyltARN synthétases, la tARN nucléotidyltransférase, serait affectée dans les mêmes conditions.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec A. FAVRE.

Préparation du tARN irradié

Une solution de tARN-pX dans du tampon cacodylate de sodium 2 10^{-2}M, pH 7,4, acétate de Mg 2 10^{-3}M est irradiée à 335 nm pendant 1 heure (101). Un échantillon témoin est maintenu à l'obscurité. Ce tARN a été préparé par traitement de tARN de E. coli total par la phosphodiestérase de venin de serpent dans les conditions décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes, car la technique d'oxydation periodique détruit le 4 thiouracile.

On estime que 50 % des tARN de E. coli renferment un 4thiouracile en position 8 et une cytosine en position 13 et seront susceptibles de réagir avec formation du dimère 4-thiouracile-cytosine. 20 % des tARN renferment un 4-thiouracile en position 8 mais pas de cytosine en position 13. Dans ce cas le thiouracile est détruit, plus lentement, par l'irradiation. Enfin, 30 % des tARN ne renferment pas de thiouracile et ne sont pas touchés. Le taux de formation des ponts 4thiouracile$_8$-cytosine$_{13}$ est déterminé après réduction par le borohydrure de sodium par la fluorescence du produit thiouracile-cytosine réduite (113). Il est dans l'expérience présente de 90-95 %. Dans la population de molécules ainsi obtenues 50 % environ renferment le lien TU-C et 3,5 % un résidu TU photolysé. Les autres molécules, soit 46,5 %, sont intactes.

Effet sur l'activité du tARN à l'égard de la tARN nucléotidyltransférase.

Nous avons comparé la vitesse et le taux d'incorporation d'AMP en présence de CTP (synthèse de la séquence normale -pCpCpA) (figure 12), de CMP (synthèse des séquences -pCpC puis -pCpCpC) (figure 13), d'AMP en l'absence de CTP (synthèse de la séquence -pA) (figure 14) et d'UMP (synthèse de la séquence -pU) (figure 15), dans ce tARN irradié et le tARN témoin. Dans tous les cas on constate que la vitesse d'incorporation n'est pas modifiée par l'irradiation et que les taux d'incorporation sont très voisins.

Effet sur l'activité du tARN à l'égard des aminoacyl-tARN synthétases.

Nous avons parallèlement examiné la vitesse et le taux d'aminoacylation de tARN irradié ou non, dont la séquence 3' terminale -pCpCpA a été restaurée par action de la tARN nucléotidyltransférase de E. coli. L'aminoacylation a été réalisée dans

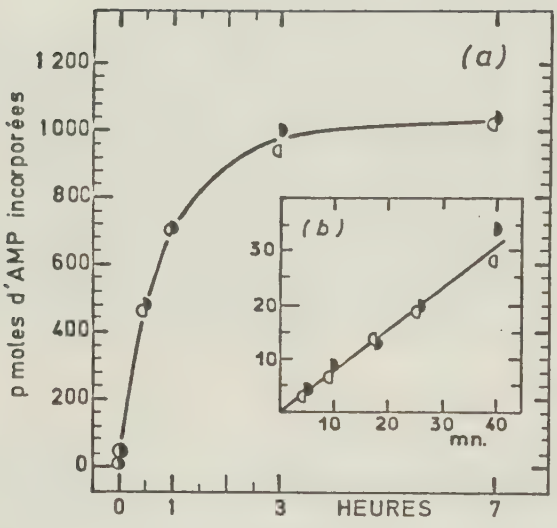


Figure 12

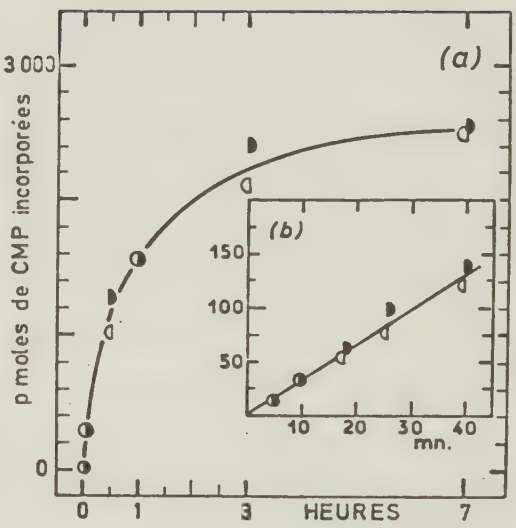


Figure 13

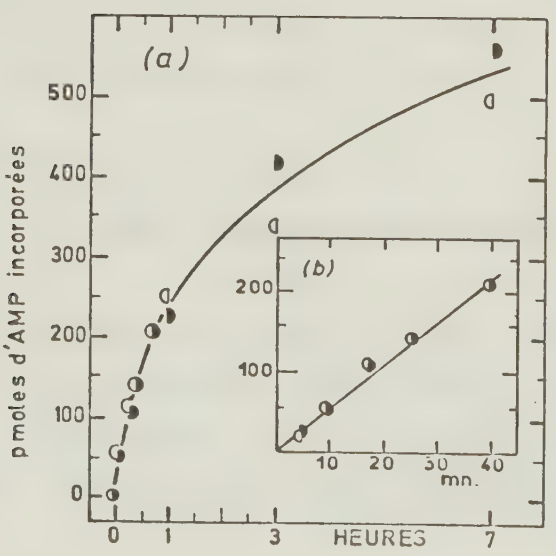


Figure 14

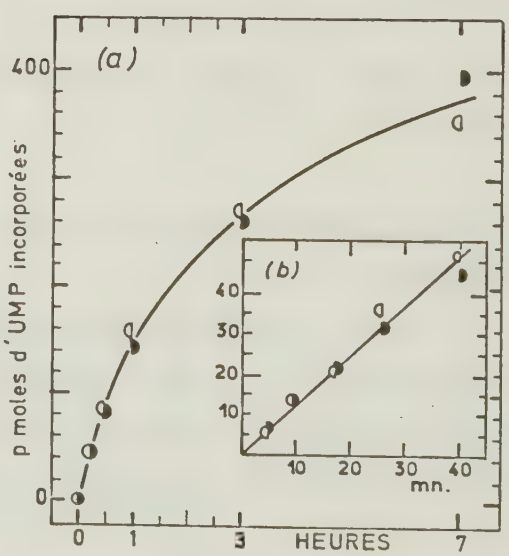


Figure 15

Figure 12 à 15 - Effet de l'irradiation à 335 nm sur l'activité du tARN à l'égard de la tARN nucléotidyl-transférase.

- ○ tARN de E. coli -pX témoin, non irradié (2,60 nmoles)
- ● tARN de E. coli -pX irradié à 335 nm pendant 1 heure (2,60 nmoles)

Figure 12 - Incorporation d'AMP en présence de CTP.

a) Cinétique de 0 à 7 heures.
Le mélange réactionnel standard renferme 120 unités de tARN nucléotidyltransférase, 40 nmoles de ^{3}H-ATP et 40 nmoles de CTP.

b) Phase initiale de la cinétique (0 à 40 mn)
12 unités de tARN nucléotidyltransférase, mêmes concentrations en nucléotides.

Figure 13 - Incorporation de CMP.

a) Cinétique de 0 à 7 heures.
120 unités de tARN nucléotidyltransférase, 40 nmoles de ^{3}H-CTP.

b) Phase initiale de la cinétique (0 à 40 mn).
12 unités de tARN nucléotidyltransférase.

Figure 14 - Incorporation d'AMP (sans CTP)

a) Cinétique de 0 à 7 heures.
120 unités de tARN nucléotidyltransférase, 40 nmoles de ^{3}H-ATP.

b) Phase initiale de la cinétique (0 à 40 mn).
120 unités de tARN nucléotidyltransférase.

Figure 15 - Incorporation d'UMP

a) Cinétique de 0 à 7 heures.
120 unités de tARN nucléotidyltransférase, 40 nmoles de ^{3}H-UTP, 2 µmoles de Mg^{++} et 0,1 µmole de Mn^{++}.

b) Phase initiale de la cinétique (0 à 40 mn)
60 unités de tARN nucléotidyltransférase, mêmes concentrations en nucléotide et en ions.

les conditions décrites dans le chapitre Méthodes, avec un mélange de 14 ^{14}C acides aminés de concentration et d'activité spécifique identique (L-alanine, L-arginine, acide L-aspartique, acide L-glutamique, glycine, L-leucine, L-isoleucine, L-lysine, L-phénylalanine, L-proline, L-sérine, L-thréonine, L-tyrosine, L-valine). Nous avons aussi examiné le comportement d'un tARN qui est quantitativement modifié, le tARN ^{val}.

Le tableau 8 montre que le taux d'aminoacylation n'est pas affecté par l'irradiation et l'est peu par l'enlèvement et la remise des trois nucléotides terminaux. Lorsque ceux-ci sont absents l'aminoacylation par les 14 acides aminés étudiés est réduite à moins de 1 %, il en est de même pour la valine seule.

Si le taux d'aminoacylation n'est pas modifié par la formation d'une liaison thiouracile$_8$-cytosine$_{13}$ l'affinité des synthétases pour le tARN est abaissée (104). Ceci retentit sur la vitesse de la réaction d'aminoacylation comme le montrent les figures 16a et 16 b. La valine est incorporée environ deux fois moins vite dans le tARN irradié que dans le tARN non irradié. Ceci est en accord avec la diminution d'un facteur trois de l'affinité du tARN^{val} pour la valine-tARN-synthétase observée par YANIV et al. (104) après irradiation du tARN. L'effet est moins important avec un mélange d'acides aminés, ce qui traduit vraisemblablement le fait que 50 % des tARN sont intacts.

CONCLUSION

L'irradiation à 335 nm entraine la formation d'une liaison covalente entre le thiouracile en position 8 et la cytosine en position 13 des molécules de tARN qui possèdent ces deux bases. Cette liaison se fait au même taux dans un tARN dépourvu d'un ou de trois nucléotides 3' terminaux que dans le tARN complet. Ceci indique que l'enlèvement de la séquence 3' terminale pCpCpA

tARN utilisé	incorporation d'acides aminés (nmoles par mg de tARN)	%
tARN de E. coli non traité	13,8	100
tARN de E. coli-pX non irradié	0,09	0,6
tARN de E. coli-pX irradié	0,12	0,9
tARN de E. coli-pX(pCpCpA) non irradié	11,2	81
tARN de E. coli-pX(pCpCpA)	10,5	76

Tableau 8 - Effet de l'irradiation à 335 nm sur le taux de charge du tARN.

La séquence 3' terminale des tARN irradié ou non a été restaurée dans les conditions suivantes : volume réactionnel de 1,5 ml renfermant : Tris-HCl, pH 8,5, Mg^{++}, βmercaptoéthanol aux concentrations standards, 300 nmoles d'ATP, 300 nmoles de CTP, 338 µg de tARN et 240 unités de tARN nucléotidyltransférase. Incubation 3 heures à 37°, précipitation par l'éthanol en présence d'acétate de K. Le précipité est repris et dialysé extensivement contre du tampon Tris-HCl 10^{-2}M, pH 8,5, acétate de Mg 10^{-3}M.

L'aminoacylation est réalisée avec des aliquotes de 30 à 37 µg de tARN dans les conditions décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes avec une préparation brute d'aminoacyltARN synthétases (125 µg de proteines)

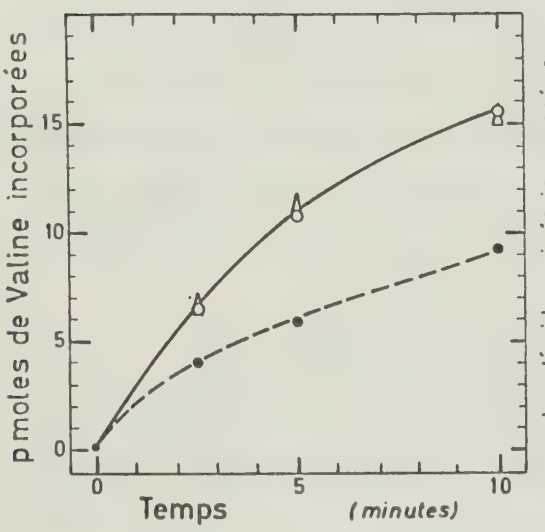


Figure 16a

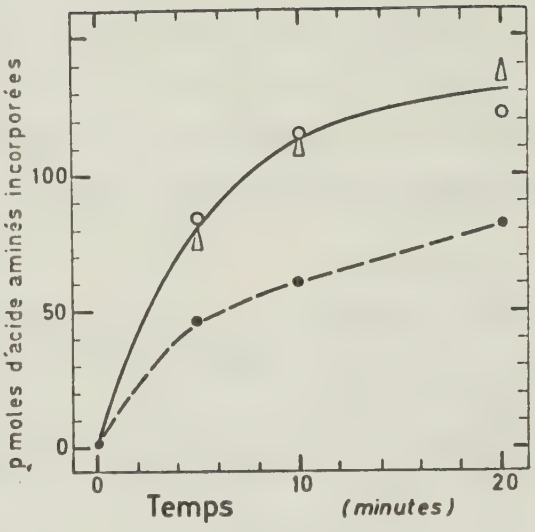


Figure 16b

Figure 16 - Effet de l'irradiation à 335 nm sur la vitesse d'aminoacylation du tARN.

- o tARN pX non irradié, réparé par action de la tARN nucléotidyltransférase.
- • tARN-pX irradié, réparé par action de la tARN nucléotidyltransférase.
- Δ tARN-pXpCpCpA natif, non irradié

Les tARN ont été préparés comme indiqué dans la légende du tableau précédent. L'aminoacylation a été réalisée dans les conditions standards sur des aliquotes de 40,5 µg de tARN.

Figure 16a- Cinétique d'incorporation de valine.

Figure 16b- Cinétique d'incorporation d'un mélange de 14 acides aminés.

n'entraine pas un remaniement important de la structure spatiale du tARN provoquant l'éloignement des bases en position 8 et 13.

Dans une préparation de tARN totaux de E. coli irradiée extensivement on estime à environ 50 % la proportion de molécules de tARN présentant une liaison 4thiouracile$_8$-cytosine$_{13}$ et 3,5 % la proportion de molécules dont le thiouracile a été détruit. Dans ces conditions, ni la vitesse ni le taux d'incorporation d'AMP et de CMP par la tARN nucléotidyltransférase ne sont diminués, alors que, si le taux d'aminoacylation est inchangé, la vitesse en est fortement diminuée. Il en est de même de la vitesse à laquelle l'aminoacyltARN formé est utilisé dans un système proteique in vitro (104). Ceci montre que l'activité de la tARN nucléotidyltransférase sur un tARN ne nécessite pas une transconformation de la molécule conduisant à l'écartement de la région 4 thiouracile$_8$-cytosine$_{13}$. Cette enzyme, dont la spécificité concerne l'ensemble des tARN n'est pas très sensible à des modifications localisées de la région 4 thiouracile$_8$ contrairement aux aminoacyl-tARN synthétases dont la spécificité est plus grande. Par contre les différents facteurs mis en oeuvre dans la synthèse proteique, qui ont eux aussi une reconnaissance globale de tous les tARN, sont sensibles à ces modifications.

En outre, les incorporations anormales de nucléotides, comme celle de l'UMP ou de l'AMP dans un tARN-pX, ne sont pas non plus affectées par les effets de l'irradiation. Ceci indique que ces incorporations anormales ne mettent pas en oeuvre de conformations rares ou de déformations de la molécule impliquant la région étudiée.

2 / ARN DU VIRUS DE LA MOSAIQUE JAUNE DU NAVET

La séquence finale de l'extrémité 3' du génôme des virus et phages à ARN s'est révélée être, dans tous les cas où elle a été déterminée -pCpC ou -pCpCpA. Le cas des ARN de reovirus constitue la seule exception (108).

La séquence 3' terminale de l'ARN du virus de la mosaique jaune du navet (TYMV) était encore inconnue lorsque fut mise en évidence la capacité de cet ARN de fixer la valine (109-111), et cela par une liaison analogue à celle qui existe dans le valyl tARN.

1) Incorporation d'AMP catalysée par la tARN nucléotidyltransférase.

L'aminoacylation de l'ARN de TYMV réalisée en présence d'ATP par un extrait brut de E. coli débarrassé d'acides nucléiques, n'a pas lieu avec une préparation purifiée de valyltARN synthétase. Ceci peut signifier que l'enzyme réalisant la fixation de valine est autre que la valyltARN synthétase, ou que l'ARN de TYMV nécessite une modification pour être substrat. C'est effectivement le cas et un traitement de l'ARN de TYMV par la tARN nucléotidyltransférase purifiée en présence d'ATP permet à cet ARN d'être aminoacylé par la valyltARN synthétase purifiée. Tout l'AMP radioactif est incorporé dans l'ARN de haut poids moléculaire du virus et sédimente avec celui-ci, dans des conditions où une association non covalente avec un tARN est exclue.

L'analyse des produits de l'hydrolyse alcaline de l'ARN de TYMV marqué par de l'α ^{32}P-ATP a montré que l'AMP est incorporé après un CMP. (112)

2) Incorporation de CMP après traitement à la phosphodiestérase de venin.

Après traitement à la phosphodiestérase de venin de serpent, l'ARN de TYMV est susceptible d'accepter du CMP et de

l'AMP (en présence de CTP) (tableau 9). Le rapport C/A est de 2,3. Le traitement à la phosphodiestérase entraine une dégradation importante de l'ARN, comme le montre sédimentation en gradient de glycérol ou filtration sur Sephadex, mais le matériel marqué, qui représente l'extrémité 3' terminale des molécules sédimente d'une manière très homogène autour de 5 S (116).

De la même manière, l'ARN de TYMV marqué à son extrémité par l'AMP ou le CMP, soumis à l'endonucléase de ROBERTSON, responsable de la maturation des tARN (114), subit une hydrolyse importante, mais une entité de 4,5 S renfermant la totalité du marquage, échappe à la dégradation (115). Ceci montre qu'il existe à l'extrémité 3' de l'ARN de TYMV une région relativement résistante à l'action des nucléases. La résistance de cette partie de la molécule à l'hydrolyse enzymatique doit être due à une structure secondaire importante. Il a été vérifié que, dans les mêmes conditions, le $tARN^{val}$ de E. coli n'est pas dégradé.

ARN	CMP incorp. mole / mole ARN	AMP incorp. mole / mole ARN	Valine incorp. mole / mole ARN
TYMV	0,08	0,63	0,69
$TYMV_{VPD}$	1,38	0,61	0,58

Tableau 9 - Incorporation d'AMP, de CMP et de valine dans l'ARN de TYMV avant ou après traitement à la phosphodiestérase de venin.

L'incorporation d'AMP dans l'ARN de $TYMV_{VPD}$ est réalisée après incorporation de CMP et celle de valine après incorporation de CMP et d'AMP.

L'ARN de TYMV forme avec la tARN nucléotidyltransférase un complexe que l'on peut isoler par centrifugation en gradient de glycerol, mais l'affinité de l'enzyme à son égard est moindre que pour les tARN (116).

Le marquage de l'ARN de TYMV par l'α^{32}P-CTP a permis de déterminer la séquence finale de cet ARN. Ces expériences sont résumées dans le tableau 10.

Nucléotide incorporé	Traitement	Produits	Séquence -MpNpOpQpR
α^{32}P-ATP	Hydrolyse alcaline	Cp*	-MpNpOpQpC(pA)
α^{32}P-CTP	Hydrolyse alcaline	Cp* + Ap*	-MpNpApCp(pA)
^{14}C-val	RNAase T_1	PypApCpCpA-val*	-GpPypApCpCp(pA) (a)
α^{32}P-CTP	RNAase T_1 + U_2	CpAp*	-GpCpApCpC(pA) (b)

Tableau 10 - Analyse de la séquence 3' terminale de l'ARN de TYMV.

(a) Le produit marqué d'hydrolyse par la RNAase T_1 de l'ARN de TYMV chargé par la valine ^{14}C est un oligonucléotide de même taille (5 nucléotides) que celui qui dérive de l'hydrolyse du valyl-tARN$^{val}2$ de E. coli.

(b) Le dinucléotide formé PypAp a une migration identique par chromatographie à celle du dinucléotide produit de l'hydrolyse du tARN^{Phe} de levure dont la séquence 3' terminale est -GpCpApCpCpA, marqué dans les mêmes conditions.

CONCLUSION

La reconnaissance de l'ARN de TYMV par plusieurs enzymes spécifiques des tARN : valyl-tARN synthétase, peptidyl hydrolase (110), tARN nucléotidyltransférase, endonucléase de ROBERTSON, facteurs d'élongation (117), et son utilisation comme ARN de transfert dans un système de synthèse proteique in vitro (118), implique que cet ARN possède dans une certaine région de sa molécule une structure très voisine de celle d'un tARN. Cette structure est mise en évidence par l'apparition d'un matériel homogène sédimentant à 4,5-5 S, porteur de l'extrémité 3'OH, plus résistant à l'action des nucléases que le reste de la molécule, ayant donc vraisemblablement une forte structure secondaire.

Le cas de l'ARN de TYMV n'est pas unique. Les ARN d'autres virus du même groupe (119), celui du virus de la mosaique du brome (120) et celui du virus de la mosaique du tabac (TMV) (117, 121), dont la séquence 3' terminale est -pCpCpA, peuvent également être aminoacylés. Ce dernier est reconnu par les facteurs d'élongation lorsqu'il est chargé (117).

La constance de la séquence 3' terminale -pCpCpA (ou -pCpC) dans les ARN viraux laisse supposer que l'existence de structures analogues à celles des tARN dans ces ARN n'est pas fortuite. Cette partie de la molécule joue peut-être un rôle dans la réplication de ces ARN. La présence dans la réplicase du phage Q_β des facteurs d'élongation EF Tu et EF Ts (122) est en faveur de cette hypothèse. Il a été démontré récemment que le facteur EF 1 (analogue chez les plantes de EF Tu), en présence de GTP forme un complexe avec l'ARN de TYMV ou de TMV lorsqu'ils sont aminoacylés (117).

3 / tARN DU PHAGE T_4 SYNTHETISES IN VITRO

Le rôle physiologique de la tARN nucléotidyltransférase n'est pas connu. Les données expérimentales obtenues sur le renouvellement d'au moins l'AMP terminale de l'extrémité -pCpCpA suggèrent que l'enzyme intervient dans la réparation des molécules qui ont été amputées des nucléotides terminaux par l'action de nucléases. Il est en outre possible que l'enzyme intervienne aussi dans le processus de maturation des tARN. Cette hypothèse a été cependant affaiblie par les récentes observations rapportées sur le précurseur 5 S du $tARN^{tyr}$ du phage Ø 80 pSu_3^+ (35). Ce précurseur possède à l'extrémité 5' une séquence de 41 nucléotides supplémentaires qui est ôtée par une nucléase spécifique au cours du processus de la maturation. Du côté 3' le précurseur contient la séquence -pCpCpA, prolongée par trois nucléotides supplémentaires. On ignore quelles sont les étapes de la maturation à ce niveau. Les trois nucléotides supplémentaires seuls sont-ils enlevés ou le processus de la dégradation à ce niveau touche-t-il aussi la séquence -pCpCpA, (soit à cause de l'imprécision d'attaque d'une exonucléase, soit parce que l'endonucléase qui découpe cette extrémité le ferait juste au niveau de la liaison phosphodiester qui précède le CCA)? Par ailleurs, il n'existe, à l'heure actuelle aucune preuve que tous les tARN soient synthétisés de la même façon que le $tARN^{tyr}$ et en particulier que, dans la structure des précurseurs, la séquence terminale -pCpCpA existe toujours. On peut, en effet, imaginer que certains tARN ou même la majorité d'entre eux soient synthétisés sans cette extrémité. Le premier rôle de la tARN nucléotidyltransférase serait alors d'ajouter aux précurseurs l'extrémité -pCpCpA.

Pour examiner ce problème, seul le système de transcription *in vitro* peut être utilisé. Cependant, son emploi pose, déjà à priori, des problèmes difficiles. Celui d'obtenir des quantités suffisantes de matériel pour pouvoir démontrer qu'il peut être aminoacylé sans, ou après addition de l'extrémité

pCpCpA est le plus grand. En effet, jusqu'à présent, dans aucun laboratoire, il n'a été possible d'obtenir, in vitro, suffisamment de tARN pour envisager des essais d'aminoacylation (123).

Nous avons entrepris ce type d'expériences en utilisant l'ADN du bactériophage T_4 et en espérant que l'emploi d'enzymes hautement purifiés ainsi que de nucléotides et d'aminoacides tritiés de très haute radioactivité spécifique nous permettra d'obtenir des informations sur l'extrémité 3' OH des tARN de ce phage. Chez les bactéries infectées par ce phage, 5 tARN spécifiques ont été mis en évidence (124 - 129). Ils permettent de traduire certains codons, rares chez E. coli, mais fréquents dans les messagers du phage (130). Les gènes de ces tARN sont parmi les gènes dits ultra-précoces et sont exprimés in vivo même en présence de chloramphénicol (131). Ils peuvent donc être transcrits par la seule polymérase de E. coli. Ils le sont également in vitro, en présence ou en l'absence de facteur ρ, comme l'ont montré les expériences d'hybridation et de compétition du produit de transcription avec des tARN isolés de bactéries infectées par le phage T_4 réalisées par J.M. BUHLER (132). Pour espérer synthétiser le précurseur exact du tARN, à l'extrémité 3' normale, il faut que la transcription soit aussi fidèle que possible, l'initiation et la terminaison correctes, et pour cela travailler en présence des facteurs σ et ρ. Or le facteur ρ ne fonctionne, avec l'ADN de T_4, qu'à faible force ionique et, dans ces conditions, in vitro, l'ARN polymérase est incapable de réinitier. On a donc 1 chaine polynucléotidique synthétisée par molécule d'enzyme, et les quantités d'ARN produites sont toujours relativement faibles.

Nous avons mesuré l'incorporation d'AMP, seul et en présence de CTP et l'incorporation de CMP sur trois échantillons différents de produit de transcription in vitro de l'ADN du phage T_4. Les nucléotides utilisés possèdent une très haute activité spécifique (2500 cpm / pmole) mais sont employés à des

concentrations très inférieures à leur K_M. L'incorporation dans ces conditions est de 30 % par rapport à ce qu'elle est dans les conditions optimales. Les incorporations d'AMP et de CMP observées sont trop faibles pour être suffisamment significatives (moins de 0,005 moles d'AMP incorporées pour 100 moles de nucléotides polymérisées ; l'incorporation de CMP est encore plus faible). L'aminoacylation de cet ARN par la leucine donne des résultats analogues.

Nous avons essayé de purifier le tARN présent dans la préparation par filtration du produit de transcription sur une colonne de tARN nucléotidyltransférase couplée de manière covalente au Sepharose (133). D'une manière surprenante, la totalité du produit de transcription a été retenue. Ceci pourrait s'expliquer si chaque molécule d'ARN de poids moléculaire élevé renfermait une molécule de tARN. Les résultats de S. LITVAK (116), cependant, montrent que la spécificité pour le tARN de cette enzyme insolubilisée n'est pas absolue et qu'elle présente une faible affinité pour d'autres ARN.

CONCLUSION

L'intervention de la tARN nucléotidyltransférase dans la synthèse des tARN reste à l'état d'hypothèse. Si le cas du $tARN^{tyr}$ devait être étendu aux autres tARN, elle ne pourrait intervenir qu'après scission des précurseurs au niveau du CCA.

4/ AUTRES ARN ET POLYMERES SYNTHETIQUES

Nous avons cherché à savoir si d'autres ARN et polynucléotides synthétiques pouvaient être substrats de la tARN nucléotidyltransférase et si des structures analogues à celles de tARN, reconnues comme telles par la tARN nucléotidyltransférase pouvaient être démasquées dans ces ARN par divers traitements.

RESULTATS

Le poly A, le poly C, le poly U, le poly I, le poly G, le poly (A:U) ne sont pas substrats de la tARN nucléotidyltransférase (moins de 0,0005 moles d'AMP ou de CMP incorporées par mole de polymère). Ils ne sont pas non plus inhibiteurs de l'incorporation d'AMP dans du tARN de levure à une concentration égale à celle du substrat.

L'ARN ribosomal (23 S) natif n'est non plus ni substrat ni inhibiteur. Afin de démasquer d'éventuelles séquences et structures analogues à celles de tARN dans l'ARN ribosomal nous lui avons fait subir plusieurs traitements dégradatifs :

1) Dénaturation thermique, mettant en évidence les coupures préexistant dans la molécule et pouvant rendre accessibles des régions masquées dans la molécule native.

2) Traitement à la phosphodiestérase de venin de serpent et à l'endonucléase qui l'accompagne.

3) Digestion limitée à la RNAase pancréatique après dénaturation thermique donnant des fragments de constante de sédimentation 4-5 S, suivie d'un traitement à la phosphatase alcaline afin de régénérer des extrémités 3' OH. De tels traitements permettent de sélectionner des fragments plus résistants à l'action des nucléases, donc plus structurés et par conséquent plus susceptibles de renfermer des structures analogues à celles de tARN.

Le tableau 11 résume les résultats de ces traitements.

ARN utilisé	AMP et CMP incorporés (moles / mole d'ARN)
ARN 23 S natif (23 S)	< 0,002
ARN 23 S dénaturé (∼10 S)	< 0,002
ARN 23 S RNAase + phosph. (∼4 S)	< 0,002
ARN 16 + 23 S Phosphodiest.	0,094

Tableau 11 - Incorporation de nucléotides dans des fragments d'ARN ribosomal.

L'incorporation de nucléotides dans l'ARN ribosomal traité à la phosphodiestérase de venin a été étudiée plus en détails. Elle s'est révélée être essentiellement du CMP (95 %). L'incorporation d'AMP en présence de CTP froid est la même qu'en l'absence de CTP.

La même étude a été faite avec de l'ARN 5 S (Tableau 12).

ARN utilisé	AMP incorp.(+CTP) (mole / mole d'ARN)	CMP incorp.(+ATP) (mole / mole d'ARN)
ARN 5 S	0,023	0,039
ARN 5 S phosphodiest.	0,012	0,096

Tableau 12 - Incorporation de nucléotides dans l'ARN 5 S.

On observe à nouveau principalement une incorporation de CMP, stimulée après traitement de l'ARN à la phosphodiestérase de venin. La faible incorporation d'AMP reflète peut-être une contamination (2 %) de l'ARN 5 S par des tARN ou des précurseurs de ceux-ci.

Une observation analogue a été faite par Simon LITVAK en ce qui concerne l'ARN de la mosaique du tabac qui incorpore après traitement à la phosphodiestérase jusqu'à 0,43 moles de CMP par mole d'ARN, mais pas d'AMP (116).

DISCUSSION

La tARN nucléotidyltransférase de E. coli ne reconnait pas divers polymères synthétiques mono ou bicaténaires, mais par contre elle peut utiliser pour une incorporation de CMP des ARN naturels après dégradation partielle. Un phénomène analogue a été décrit par DEUTSCHER (82) pour la tARN nucléotidyltransférase de foie de lapin et par KLEMPERER et HAYNES (86) pour l'enzyme de foie de rat en présence de Mn^{++}. Dans ce dernier cas les ARN sont de bien meilleurs substrats après traitement par la phosphodiestérase de venin. L'ARN 5 S présente également, comme dans notre cas, une légère incorporation d'AMP. Mais en présence d'enzymes d'eucaryotes l'amplitude du phénomène est beaucoup plus importante qu'avec la tARN nucléotidyltransférase de E. coli : dans ce cas, l'incorporation de CMP correspond à une synthèse de poly C contenant jusqu'à 40 nucléotides. Ces incorporations dépendent de la quantité d'enzyme utilisée et du traitement subi par les ARN. Les résultats montrent que la tARN nucléotidyltransférase peut, d'une façon moins spécifique qu'avec les tARN, réagir avec d'autres ARN, qu'elle utilise comme amorce. Son activité poly C synthétase observée dans ces cas-là est à rapprocher de celle de l'ARN polymérase qui, dans certains cas, catalyse la synthèse de poly A.

- IV -

ETUDE DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE

A / ETUDE CINETIQUE DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE

Nous avons vu dans le chapitre précédent les diverses réactions que la tARN nucléotidyltransférase est capable de catalyser. La réaction la plus simple peut s'écrire :

$$\text{tARN-pXpCpC} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{tARN-pXpCpCpA} + PP_i.$$

Cette réaction fait intervenir 1 molécule de tARN dépourvue de l'AMP terminale et 1 molécule d'ATP comme substrats, le tARN complet et le pyrophosphate comme produits. Pour l'incorporation de CMP dans le tARN-pX la réaction présente une degré de complexité double, dans la mesure où l'on ne peut dissocier les deux réactions successives qui vont avoir lieu :

$$\text{tARN-pX} + \text{CTP} \rightleftharpoons \text{tARN-pXpC} + PP_i.$$

$$\text{tARN-pXpC} + \text{CTP} \rightleftharpoons \text{tARN-pXpCpC} + PP_i.$$

Ceci, en négligeant les réactions "anormales" d'addition de CMP supplémentaires conduisant à la formation de séquences -pXpCpCpC.

La complexité des réactions telles que nous les étudions est plus grande encore du fait que nous avons travaillé avec du tARN total de E. coli ou de levure et non d'une espèce purifiée de tARN. Dans ce cas, le substrat noté tARN-pXpCpC, par exemple, est en fait un mélange de quelques 40 tARN de structures primaires et secondaires différentes. Selon MILLER et PHILIPPS (134), l'affinité de la tARN nucléotidyltransférase pour ces divers tARN est très voisine. Ce qui autorise à négliger ces différences, en première approximation.

A cette hétérogénéité due à la diversité des tARN s'ajoute celle qui existe à un certain degré au niveau de l'extrémité 3' ; en effet, les techniques employées ne permettent pas d'obtenir une dégradation à 100 % uniforme.

En conséquence, l'étude cinétique de la catalyse enzymatique est difficile et les conclusions tirées de cette étude doivent l'être avec beaucoup de précautions. En aucun cas la qualité des informations obtenues, ni leur quantité ne peuvent être comparées à celles des informations fournies par un enzyme dont le substrat est simple. Les variations dans la composition du substrat et par voie de conséquence dans la nature des réactions possibles et la difficulté d'obtenir un enzyme vraiment pur peuvent rendre compte des divergences et des contradictions que l'on rencontre entre les données cinétiques des divers groupes qui ont travaillé sur cet enzyme.

1 - MODE D'ADDITION PAR LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE DES NUCLEOTIDES AU tARN-pX.

La tARN nucléotidyltransférase catalyse l'addition séquentielle des trois nucléotides terminaux pCpCpA au tARN-pX. On peut imaginer deux modes d'addition. Dans le premier cas, une molécule d'enzyme va former un complexe stable et catalyser l'addition successive à ce tARN de 2 résidus de CMP et d'un AMP, synthétisant la séquence -pCpCpA complète avant de se détacher de la molécule de tARN terminée, à extrémité 3' -pXpCpCpA. C'est le cas d'enzymes comme l'ARNpolymérase, par exemple, ou la PNPase. Ce mode de synthèse est dit processif ou asynchrone. Dans l'autre cas l'enzyme va se détacher du tARN après chaque addition de nucléotide et s'attacher au hasard à une autre molécule de tARN. Ce mode d'action est dit non processif ou synchrone. Un exemple en est celui de la phosphodiesterase de venin de serpent dans la dégradation des polynucléotides.

Ces deux hypothèses conduisent à des résultats différents en ce qui concerne les cinétiques d'incorporation de CMP et d'AMP dans du tARN -pX. Dans le premier cas, l'incorporation d'AMP suivra une courbe analogue à celle de CMP puisque, pour deux molécules de CMP, une molécule d'AMP est incorporée dans le tARN. Le temps de synthèse d'une séquence pCpCpA est inappréciable avec les techniques utilisées. Dans le second cas, l'enzyme dans un premier temps, incorporera essentiellement du CMP en position n-3, l'incorporation de CMP en position n-2 suivant une cinétique d'ordre 2 et celle d'AMP une cinétique d'ordre 3. On devrait observer pour l'incorporation de ce dernier un temps de latence suivi d'une incorporation exponentielle.

La figure 17 montre qu'il n'en est pas ainsi, que les deux cinétiques sont linéaires et que l'incorporation d'AMP commence dès le début de la réaction. Par conséquent, la tARN nucléotidyltransférase est un enzyme qui pourrait s'attacher à son substrat polynucléotidique et synthétiser la totalité de la séquence pCpCpA avant de s'en détacher. Cependant, on constate que, dans les conditions utilisées : concentration saturante en ATP, CTP et tARN, la vitesse d'incorporation de CMP est d'environ 9 fois plus grande que celle d'AMP (on s'attendrait à 2 fois si seule la séquence -pCpCpA était synthétisée). Ceci implique que, dans de nombreux cas l'incorporation de CMP n'est pas suivie de celle d'AMP, soit qu'il y ait synthèse non négligeable de séquences -pCpCpC, soit encore qu'il y ait détachement de l'enzyme du tARN avant terminaison de la séquence -pCpCpA. L'achèvement de l'extrémité 3' OH n'est donc pas une exigence pour le détachement de l'enzyme du tARN. Il n'y a pas non plus dissociation automatique après chaque addition, suivie d'une fixation au hasard sur une nouvelle molécule de tARN.

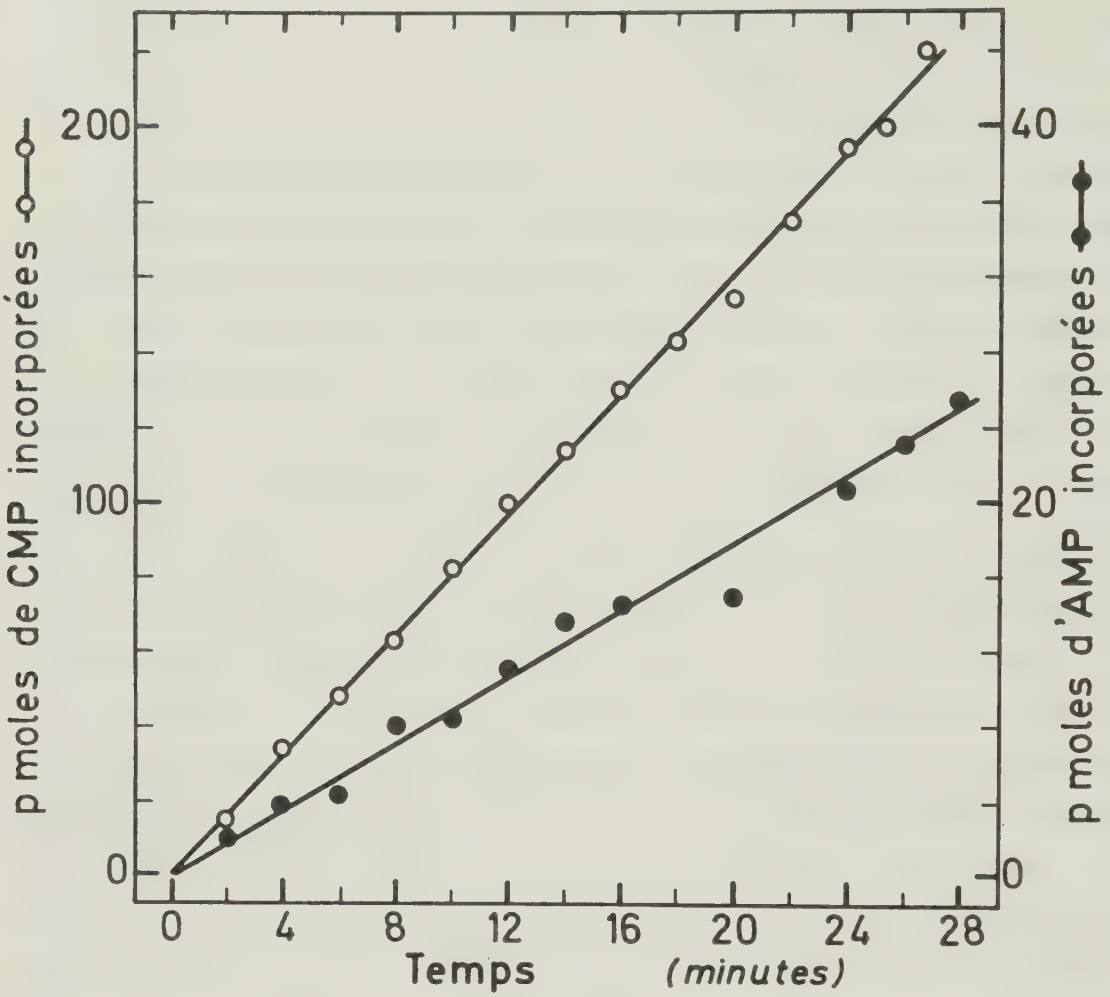


Figure 17 - Mode d'incorporation des nucléotides dans le tARN-pX

- tARN de E. coli -pX (obtenu par oxydation periodique) 25 nmoles / essai (volume du milieu d'incubation 0,1 ml)
- ^{14}C-CTP 4,58 10^{-5}M (activité spécifique 5,2 cpm/pmole)
- ^{3}H-ATP 0,96 10^{-3}M (activité spécifique 54,4 cpm/pmole)

Tout récemment, TAL et col. (84) ont examiné le même problème mais en utilisant une approche différente. Ils ont dosé la quantité de tARN-pXpCpCpA formé après incubation de tARN-pX en présence de quantités variables et limitantes de CTP et d'un excès d'ATP, par sa capacité de fixer des acides aminés en présence d'aminoacyl-tARN synthétases. Parallèlement ils ont mesuré l'incorporation totale de CMP. Celle-ci est linéaire en fonction de la quantité de CTP utilisée, alors que la capacité d'incorporation d'acides aminés présente une courbe sigmoïdale reflétant, selon les auteurs, le détachement de l'enzyme du tARN après chaque addition de nucléotide, conduisant à une synthèse préférencielle de séquences -pXpC inaptes à accepter de l'AMP et des acides aminés lorsque le CTP est très limitant, l'apparition de séquences pXpCpC étant plus tardive et traduisant la saturation du tARN-pXpC par le CMP. Il est à remarquer que le type d'expérience choisie par ces auteurs les oblige à utiliser des quantités limitantes de CTP et à épuiser ce substrat, ce qui peut expliquer une dissociation plus fréquente du complexe enzyme-tARN.

2 - DETERMINATION DES K_M APPARENTS DE L'ENZIME A L'EGARD DES NUCLEOTIDES.

RESULTATS

Le K_M apparent de l'enzyme vis à vis de l'ATP (figure 18 a), dans la réaction d'incorporation de l'AMP dans du tARN de levure non traité, dans les conditions standards de pH et de force ionique, déterminé par la méthode de LINEWEAVER et BURK, est de $3,3\ 10^{-4}$ M (avec une précision de $\pm\ 0,5\ 10^{-4}$ M).

Le K_M apparent de l'enzyme à l'égard du CTP, déterminé avec du tARN de E. coli traité à la phosphodiestérase de venin, comme second substrat (principalement d'extrémité 3' -pX) est de $1,7\ \ 10^{-5}$ M (figure 18b).

Le K_M apparent de l'enzyme à l'égard de l'UTP (figure 18c) pour l'incorporation de celui-ci dans du tARN de E. coli -pX (obtenu par dégradation periodique) est de 3,0 10^{-4} M.

Ces valeurs sont déterminées dans des conditions où le second substrat, le tARN, est en large excès.

Les préparations enzymatiques utilisées dans les 3 expériences étant différentes on ne peut faire ici de comparaison des V_{Max}.

DISCUSSION

Les valeurs des K_M apparents concernant l'enzyme de E. coli trouvées par différents chercheurs ne sont pas toujours concordantes. Les préparations enzymatiques diffèrent par leur origine quant à la souche de E. coli utilisée ainsi que par la méthode employée au cours de la purification et le degré de purification. Par ailleurs, les conditions dans lesquelles sont effectuées les mesures (nature du tARN utilisé, pH ...) sont souvent variables.

Le K_M vis à vis de l'ATP varie de 0,23 10^{-4} M pour FURTH et al. (17), utilisant comme substrat du tARN de levure et travaillant à un pH de 8,4, jusqu'à 1,90 10^{-4}M pour GROSS et al. (20) avec du tARN de levure également et le même pH.BEST et NOVELLI (21), avec du tARN de E. coli de séquence finale -pXpCpC obtenu par oxydation periodique et un milieu réactionnel de pH 8,5 obtiennent un K_M de 1,6 10^{-4}M et MILLER et PHILIPPS (134) avec un tARN de E. coli préparé par action de la phosphodiestérase de venin et un milieu d'incubation à pH 9,2, un K_M de 0,95 10^{-4}M. Ces derniers auteurs observent une inhibition par excès de substrat au-delà de 0,4 mM (soit environ 4 fois la valeur de leur KM), inhibition qui ne se manifeste pas dans notre cas à 0,9 mM, mais un tel effet d'inhibition nous est peut être masqué par la valeur plus élevée du K_M observée dans notre cas.

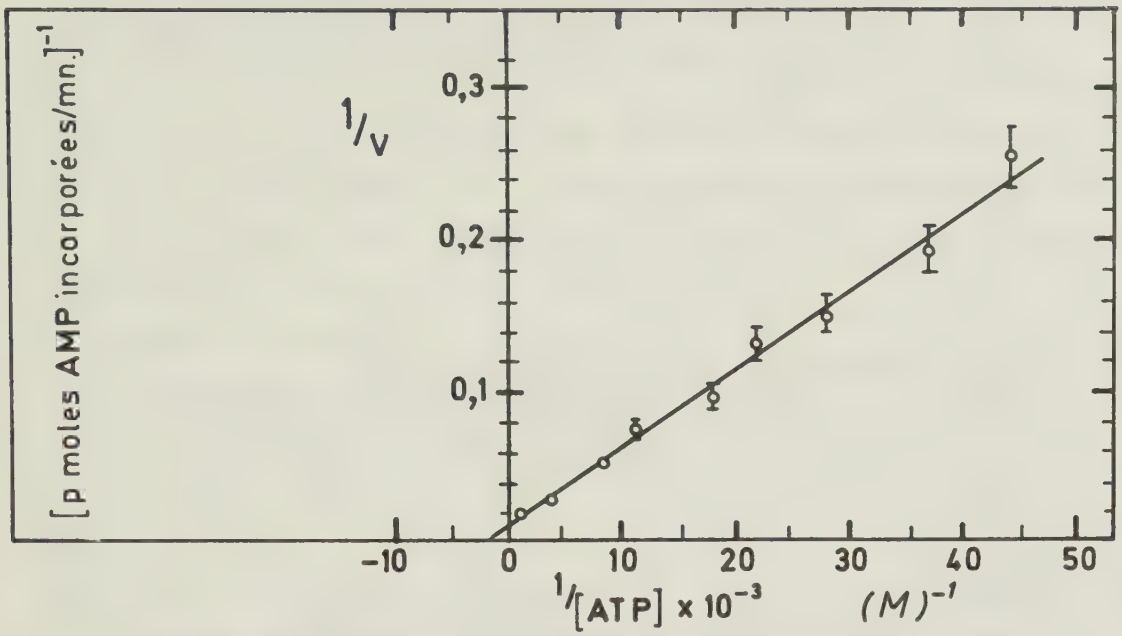


Figure 18a

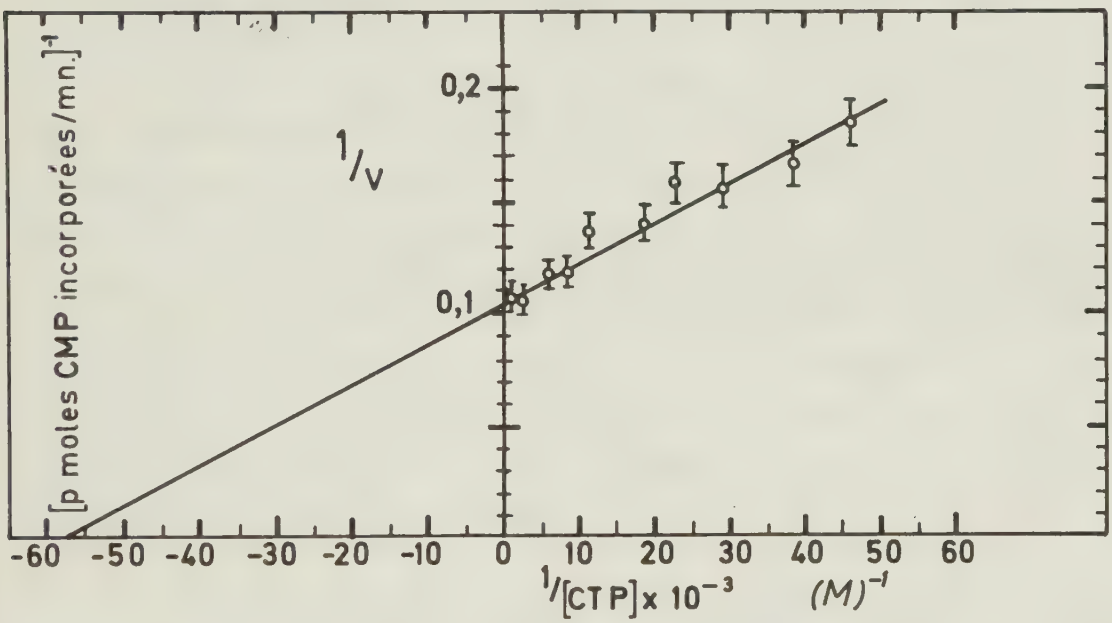


Figure 18b

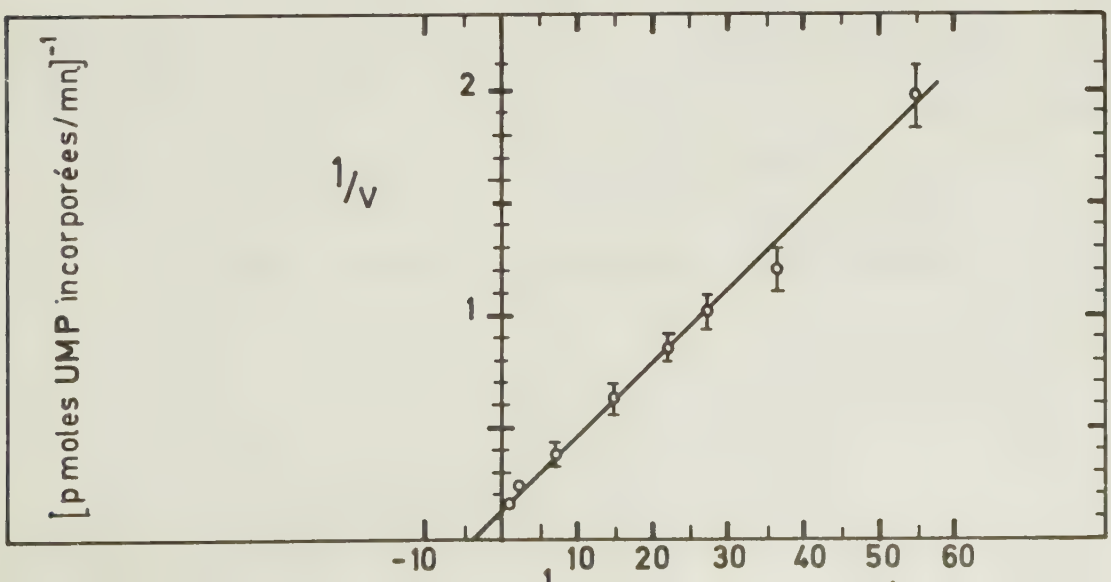


Figure 18c

Figure 18a - Détermination du K_M de la tARN nucléotidyltransférase à l'égard de l'ATP (représentation Lineweaver-Burk).
tARN de levure : 20 µM, 15 unités de tARN nucléotidyltransférase,
^{3}H-ATP de 2,24 10^{-5} à 8,95 10^{-4}M.

Figure 18b - Détermination du K_M à l'égard du CTP.
tARN de E. coli (principalement -pX) obtenu par traitement à la phosphodiestérase de venin de serpent : 30 µM.

Figure 18c - Détermination du K_M à l'égard de l'UTP.
tARN de E. coli -pX (obtenu par oxydation periodique) : 62 µM.
^{3}H-UTP de 1,82 10^{-5} à 9,1 10^{-4} M, 225 unités de tARN nucléotidyltransférase.

Remarque : Des préparations d'enzyme différentes ont été utilisées pour ces trois déterminations.

En ce qui concerne le CTP, les valeurs se trouvent d'une manière générale plus basses que pour l'ATP : $8,3\ 10^{-5}$ M pour FURTH et al (17) avec du tARN de E. coli ou de levure de séquence terminale -pX préparé par traitement à la phosphodiestérase de venin, $7,2\ 10^{-5}$ M pour GROSS et al (20) avec du tARN de levure d'extrémité -pX préparé suivant le même procédé, $6,0\ 10^{-5}$ M pour BEST et NOVELLI (21) avec du tARN de E. coli -pXpC obtenu par oxydation periodique, $1,5\ 10^{-5}$ M pour du tARN de E. coli à séquence finale -pX et $0,7\ 10^{-5}$ M pour du tARN -pXpC obtenus par dégradation enzymatique par MILLER et PHILIPPS (134). Ces auteurs ayant également étudié des tARN purifiés spécifiques de différents acides aminés, ont trouvé des valeurs de 1,1 à $2,5\ 10^{-5}$ M dans le cas où ils utilisent du tARN -pX comme substrat et de 0,64 à $1,3\ 10^{-5}$ M pour l'incorporation de CMP dans du tARN à extrémité -pXpC. On constate que, d'une manière générale, MILLER et PHILIPPS qui effectuent les mesures à un pH élevé, proche du pH optimum, obtiennent les K_M les plus bas. Dans aucun cas avec les enzymes de E. coli, on n'a mis en évidence deux K_M pour le CTP pouvant traduire la présence de deux sites pour le nucléotide comme cela a été observé pour l'enzyme de foie (89) et de muscle de lapin (135). Cependant même dans ces cas là, les courbes ne dépendent pas du degré de dégradation du substrat utilisé et par conséquent ne semblent pas refléter la présence de deux sites spécifiques de l'incorporation de l'un ou l'autre des deux résidus CMP de la séquence terminale -pCpCpA des tARN.

La différence entre les valeurs des K_M apparents à l'égard du CTP et de l'ATP est à rapprocher de la plus grande abondance de ce dernier dans les cellules : en effet, d'après BOLTON et ROBERTS (136), le rapport du pool soluble d'ATP + ADP au pool de CTP + CDP, chez E. coli, serait de 3,2 à 1.

En comparant les valeurs des K_M obtenues pour la

tARN nucléotidyltransférase de E. coli avec celles concernant des enzymes extraits d'autres organismes, on constate que le K_M apparent à l'égard de l'ATP de l'enzyme de E. coli (17, 19, 20, 21, 134) est inférieur à celui des enzymes d'eucaryotes (24, 27, 89, 135), le K_M le plus bas parmi ces derniers étant celui de l'enzyme de levure. Il en est de même pour le K_M à l'égard du CTP, sauf dans les cas où deux K_M ont été mis en évidence, la valeur de l'un d'eux étant alors inférieure à celles relatives à l'enzyme de E. coli.

En ce qui concerne le K_M de la tARN nucléotidetransférase à l'égard de l'UTP on ne possède pas d'autres données relatives à E. coli. Pour l'enzyme de foie de lapin (89) il est de 0,5 10^{-4} M avec du tARN -pXpC, c'est-à-dire une valeur intermédiaire entre celles des deux K_M à l'égard du CMP, pour l'enzyme de foie de rat (27) de 1,7 10^{-4} M c'est-à-dire identique au K_M du CTP et pour l'enzyme de muscle de lapin (83) de 2,6 10^{-4}M soit supérieure au K_M du CTP.

3 - INFLUENCE D'UN NUCLEOTIDE SUR LA VITESSE D'INCORPORATION D'UN AUTRE

RESULTATS

Le tableau 13 montre l'effet de divers nucléotides sur la vitesse d'incorporation d'AMP, de CMP et d'UMP. On constate que dans les conditions utilisées, avec un excès d'un facteur 20 ou 24 du nucléotide inhibiteur sur le nucléotide incorporé, le CTP inhibe très fortement l'incorporation d'AMP et l'ATP celle de CMP. Bien que non incorporés eux mêmes, le dATP et le dCTP inhibent aussi, mais plus faiblement, l'incorporation des ribonucléotides correspondants. Le GTP et les deux analogues de l'ATP, l'AMP-PCP et l'AMP-CPP dans lesquels une liaison phosphodiester est remplacée par un pont méthylène en position $\beta\gamma$ ou $\alpha\beta$ n'inhibent que très peu ou pas du tout l'enzyme. L'inhibition de l'incorporation d'AMP par l'UTP est nette, bien que

Addition	Pourcentage d'inhibition de l'incorporation de		
	AMP	CMP	UMP
Rien	0	0	0
ATP	-	61	95
CTP	81	-	99,4
dATP	26	9	-
dCTP	27	16	-
GTP	10	0	-
UTP	35	2	-
AMP-PCP	10	0	-
AMP-CPP	7	-	-

Tableau 13 - Effet de divers nucléosides triphosphate sur l'incorporation d'AMP et de CMP.

a) Effet sur l'incorporation d'AMP. Les concentrations étaient : tARN de E. coli -pXpCpC (obtenu par oxydation periodique) : 10,8 M (sauf dans le cas de l'AMP-CPP où il s'agissait de tARN de levure).

^{3}H-ATP : 0,21 10^{-4}M. Rapport NTP/ATP : 24

b) Effet sur l'incorporation de CMP. Les concentrations étaient : tARN de E. coli (traité à la phosphodiestérase de venin de serpent, principalement -pX) : 30 µM.

^{3}H-CTP : 10^{-4}M. Rapport NTP/CTP : 20.

c) Effet sur l'incorporation d'UTP. Les concentrations étaient : tARN de E. coli -pX (obtenu par oxydation periodique) : 31 µM.

^{3}H-UTP : 0,2 10^{-4}M. Rapport NTP/UTP : 25.

moins forte que l'inhibition par le CTP. Dans les conditions de concentration utilisées ici, l'incorporation de CTP est peu affectée par l'UTP. L'incorporation d'UMP est inhibée presque totalement par le CTP et un peu moins par l'ATP.

Le cas de certaines de ces inhibitions a été étudié plus en détails. La figure 19a montre l'étude cinétique de l'inhibition de l'incorporation d'AMP par le CTP et la figure 19b le cas inverse. La représentation choisie est celle de DIXON, variation de l'inverse de la vitesse en fonction de la concentration en inhibiteur pour deux concentrations en substrat. Les deux inhibitions sont de type non compétitif. Les valeurs des K_i sont de 2,0 10^{-4} M pour le CTP dans l'inhibition de l'incorporation d'AMP dans du tARN de E. coli -pXpCpC et de 3,7 10^{-4} M pour l'ATP dans l'inhibition de l'incorporation de CMP dans du tARN de E. coli traité à la phosphodiestérase et principalement d'extrémité -pX.

L'inhibition de l'incorporation d'UMP par le CTP est de type compétitif et le K_i du CTP dans ce cas est de 1,6 10^{-5}M (figure 19c).

DISCUSSION

Le fait que l'inhibition de l'incorporation d'AMP par le CTP et de CMP par l'ATP soient de type non compétitif suggère qu'il existe, par molécule d'enzyme, deux sites, l'un pour l'ATP et l'autre pour le CTP. Si l'on suppose que le site inhibiteur et le site catalytique pour chacun des nucléotides est le même, la concordance entre le K_M apparent et le K_i pour l'ATP semble logique, cependant la divergence qui apparait en ce qui concerne le CTP reste à expliquer.

L'inhibition de l'incorporation d'UMP par le CTP est compétitive et le K_i du CTP à l'égard de l'UTP est voisin de son K_M ce qui laisse penser que l'UMP est incorporé au lieu et

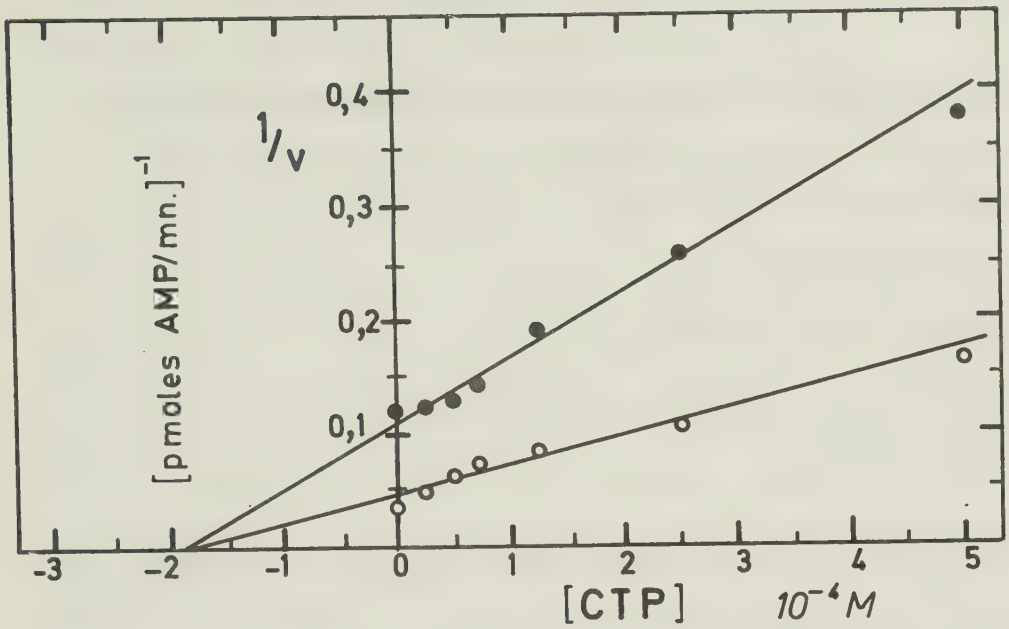


Figure 19a

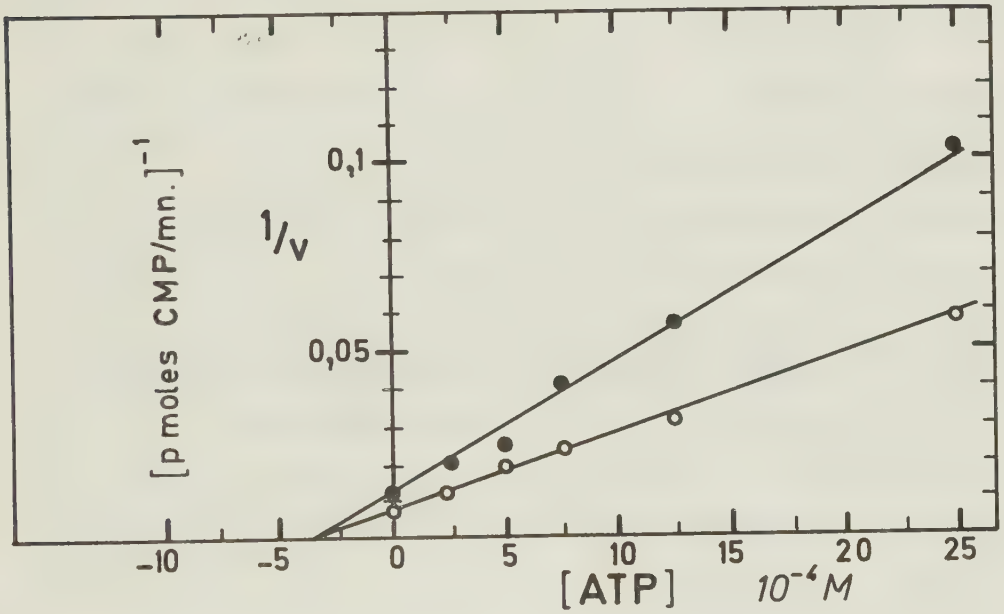


Figure 19b

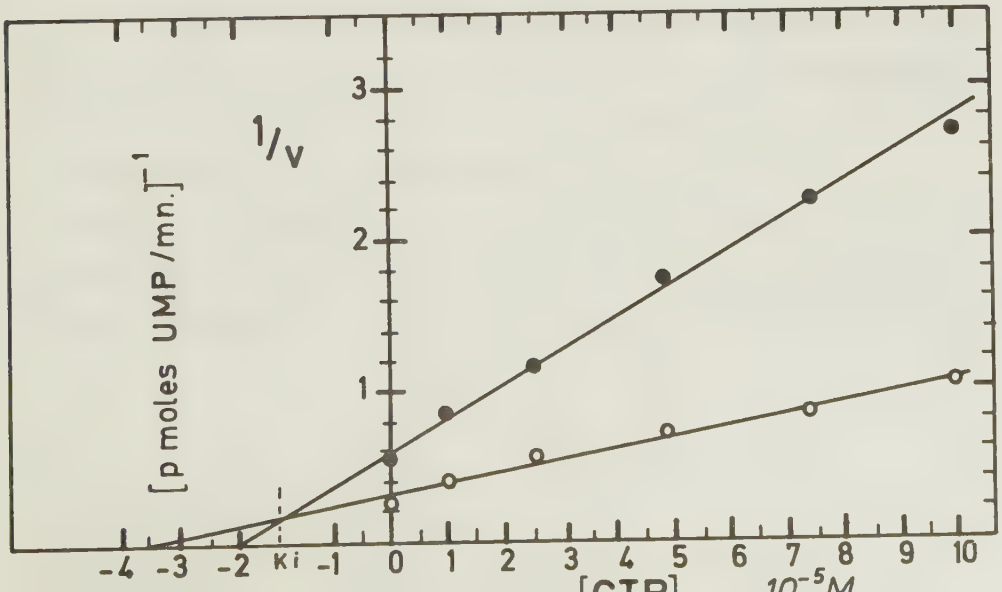


Figure 19c

Figure 19a - Inhibition de l'incorporation d'AMP par le CTP.

tARN de E. coli -pXpCpC (traité par oxydation periodique) : 10,8 µM.

^{3}H-ATP 0,21 10^{-4}M.

^{3}H-ATP 0,083 10^{-4}M.

et des concentrations croissantes de CTP non radioactif.

Figure 19b - Inhibition de l'incorporation de CMP par l'ATP.

tARN de E. coli -pX (traité par la phosphodiestérase de venin) : 30 µM.

^{3}H-CTP 10^{-4}M.

^{3}H-CTP 0,5 10^{-4}M.

et des concentrations croissantes d'ATP non marqué.

Figure 19c - Inhibition de l'incorporation d'UMP par le CTP.

tARN de E. coli -pX (traité par oxydation periodique) : 31 µM.

^{3}H-UTP 1,5 10^{-4}M.

^{3}H-UTP 0,75 10^{-4}M.

et des concentrations croissantes de CTP non radioactif.

place du CMP par le même site enzymatique. Cependant nous avons vu que certains ions métalliques peuvent influencer différemment ces deux activités. Une inhibition analogue a été trouvée dans le cas de l'enzyme de foie de rat par DANIEL et al. (27).

Les résultats que nous obtenons sont en contradiction avec ceux de BEST et NOVELLI (21), en ce qui concerne le type d'inhibitions observées entre CTP et ATP. En effet, dans leur cas, le CTP est inhibiteur compétitif de l'ATP avec un K_M voisin de celui que nous observons : 1,76 10^{-4} M ; le type d'inhibition de l'ATP sur l'incorporation de CMP n'a pas été déterminé. MILLER et PHILIPPS également (134) trouvent dans chacun des cas une inhibition de type compétitif, avec cependant des valeurs de K_i beaucoup plus élevées : 1,1 10^{-3} M pour le CTP et de l'ordre de 3,0 10^{-3} M pour l'ATP. En dehors de différences dans la méthode de purification de l'enzyme et des conditions du test déjà évoquées au sujet des K_M, il n'est pas impossible que de telles divergences soient dues également au type de représentation choisi, conduisant à travailler dans des gammes de concentration en inhibiteur et en substrat très différentes. BEST et NOVELLI ont utilisé la représentation de LINEWEAVER et BURK, faisant varier la concentration en substrat (ATP), de 0,8 à 2,5 10^{-4}M, sans inhibiteur et avec deux concentrations d'inhibiteur (CTP) 0,5 10^{-4} et 10^{-4} M. Dans notre cas, utilisant la représentation de DIXON, nous avons fait varier la concentration en inhibiteur de 0 à 5 10^{-4} M, pour deux concentrations en substrat, 0,083 10^{-4}M et 0,2 10^{-4}M.

Dans le cas des enzymes d'origine animale on possède peu de résultats. Pour l'enzyme de muscle de lapin (135) l'incorporation d'AMP est inhibée par l'UTP, le GTP et à un degré supérieur par le CTP. Cette inhibition est de type compétitif avec un K_i supérieur au K_M. En revanche l'ATP stimule l'incorporation de CMP. Pour la levure (24) les inhibitions sont de type compétitif également, le K_i du CTP étant voisin de son K_M

et le K_i de l'ATP légèrement supérieur au K_M correspondant. L'UTP est un inhibiteur compétitif de l'incorporation de CMP et également de celle d'AMP.

4 / DETERMINATION DES K_M APPARENTS DE L'ENZYME A L'EGARD DES tARN

Une étude très approfondie concernant les constantes cinétiques à l'égard de tARN totaux et de divers tARN spécifiques purifiés de différents degrés de dégradation ayant été publiée par MILLER et PHILIPPS (134) durant ce travail, nous nous sommes contentés de déterminer les constantes d'affinité de notre enzyme à l'égard du tARN de E. coli global dépourvu du nucléotide terminal et de la constante d'inhibition du tARN de E. coli complet à l'égard de ce tARN.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le K_M de l'enzyme vis à vis du tARN -pXpCpC de E. coli (obtenu par oxydation periodique) pour l'incorporation d'AMP est de $1,5\ 10^{-6}$ M si l'on estime la concentration en tARN par son absorption à 260 nm (figure 20). Cependant, si l'on considère que 43 % seulement de ce tARN est capable de fixer de l'AMP il faudrait prendre pour valeur du K_M réel à l'égard du tARN actif $0,65\ 10^{-6}$M, en supposant que le tARN non substrat n'est pas inhibiteur.

Le tARN complet, de séquence finale -pXpCpCpA est inhibiteur compétitif du tARN -pXpCpC lors de l'incorporation d'AMP, comme le montre la figure 21. La constante d'inhibition est de $0,9\ 10^{-6}$M (si l'on ne tient pas compte du degré de pureté du tARN-1 utilisé), valeur légèrement inférieure au K_M de l'enzyme à l'égard du tARN-pXpCpC.

Les K_M apparents à l'égard du tARN total de E. coli déterminés par d'autres auteurs pour la tARN nucléotidyltransférase

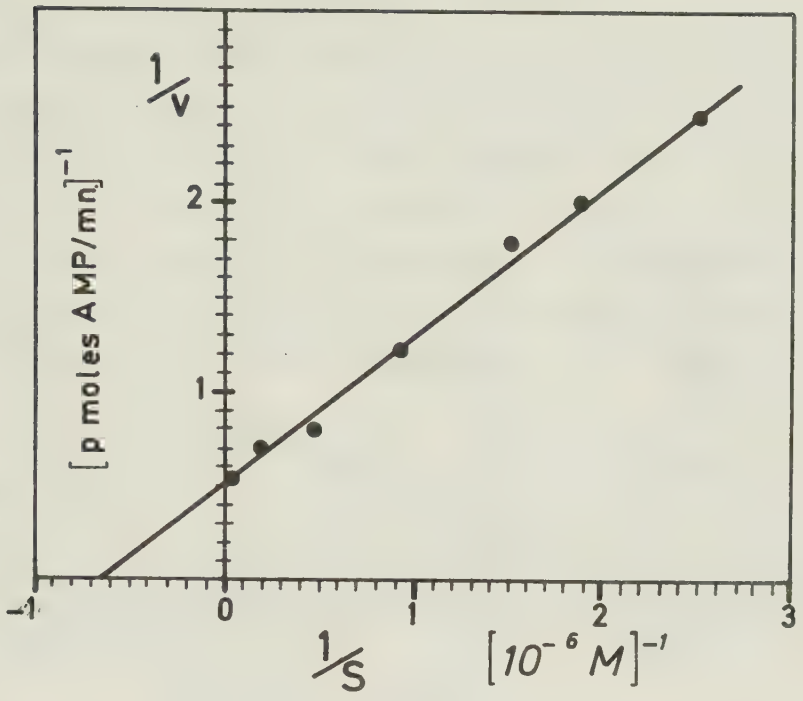


Figure 20 - Détermination du K_M de la tARN nucléotidyl-transférase à l'égard du tARN de E. coli-pXpCpC (préparé par oxydation periodique) pour l'incorporation d'AMP.

- concentration en ATP 10^{-4}M
- 5,6 unités de tARN nucléotidyltransférase

La proportion de substrat transformé durant la réaction n'excède en aucun cas 3 %.

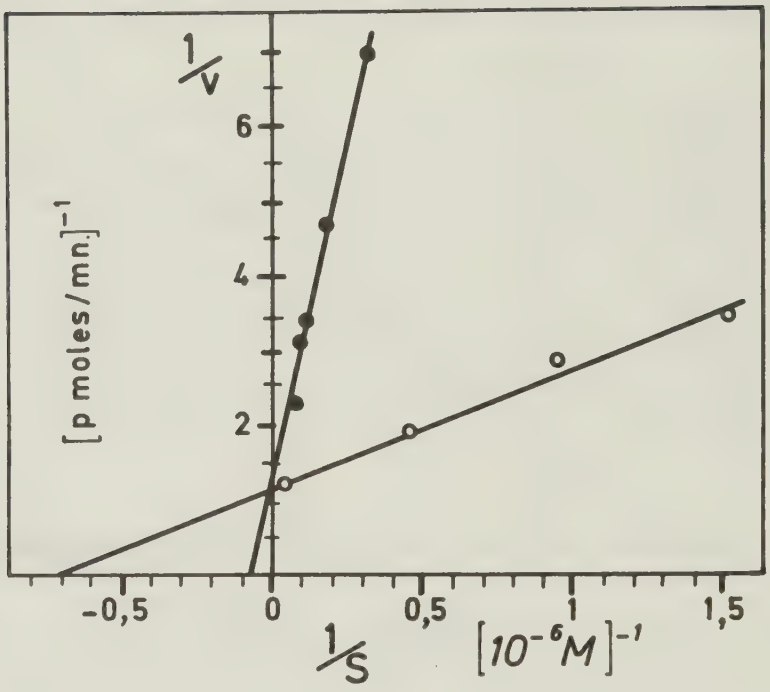


Figure 21 - Inhibition de l'incorporation d'AMP dans le tARN de E. coli -pXpCpC par le tARN de E. coli -pXpCpCpA

o — o sans tARN -pXpCpCpA

• — • tARN -pXpCpCpA 10^{-6} M

Concentration en ATP 10^{-4} M

La proportion de substrat transformé durant la réaction n'excède en aucun cas 3 %.

La concentration en substrat tient compte de la petite fraction de la préparation de tARN -pXpCpCpA susceptible d'incorporer de l'AMP.

de E. coli varient de 0,21 10^{-6} M (134) à 9,6 10^{-6} M (20) en ce qui concerne le tARN -pXpCpC pour l'incorporation de CMP et 0,20 10^{-6} M (134) à 1,8 10^{-6} M (20) pour le tARN -pX dans l'incorporation de CMP. MILLER et PHILIPPS ont observé en outre que ces tARN se comportent comme inhibiteurs compétitifs lorsqu'ils ne sont pas substrats et que leurs K_i sont alors voisins de leurs K_M (134). Le K_i du tARN complet à l'égard des tARN substrats se trouve par contre, d'un ordre de grandeur au moins supérieur à ces valeurs. RETHER (24) constate un phénomène analogue avec l'enzyme de levure mais l'inhibition exercée par le tARN intact à l'égard des autres tARN substrats est de type non compétitif.

Dans notre cas le K_i du tARN intact est voisin du K_M du tARN -pXpCpC. Ceci peut révéler une surestimation du K_M de l'enzyme vis à vis du tARN -pXpCpC, due à l'effet exercé sur la réaction d'incorporation d'AMP par la fraction de ce tARN qui n'est pas substrat.

5 - RELATION D'INHIBITION ENTRE CTP ET tARN-pXpCpC DANS LA REACTION D'INCORPORATION D'AMP DANS CE tARN.

Il était intéressant d'étudier la relation d'inhibition entre un substrat polynucléotidique et un nucléotide non substrat de la réaction étudiée. En effet, si l'on imagine pour la tARN nucléotidyltransférase un modèle comportant un site général de reconnaissance du tARN et trois sites catalytiques pouvant reconnaitre soit les 2 CMP et l'AMP finals du tARN, soit le CTP et l'ATP, comme schématisé dans la figure 22, il devrait exister une relation d'exclusion entre CTP et tARN -pXpCpC, qui pourrait se traduire par une inhibition de type compétitif de l'incorporation d'AMP dans ce tARN-pXpCpC exercée par le CTP à l'égard du tARN-pXpCpC.

La figure 23 représente la variation de l'inverse de la vitesse d'incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpC en fonction de l'inverse de la concentration en ce tARN en l'absence de CTP

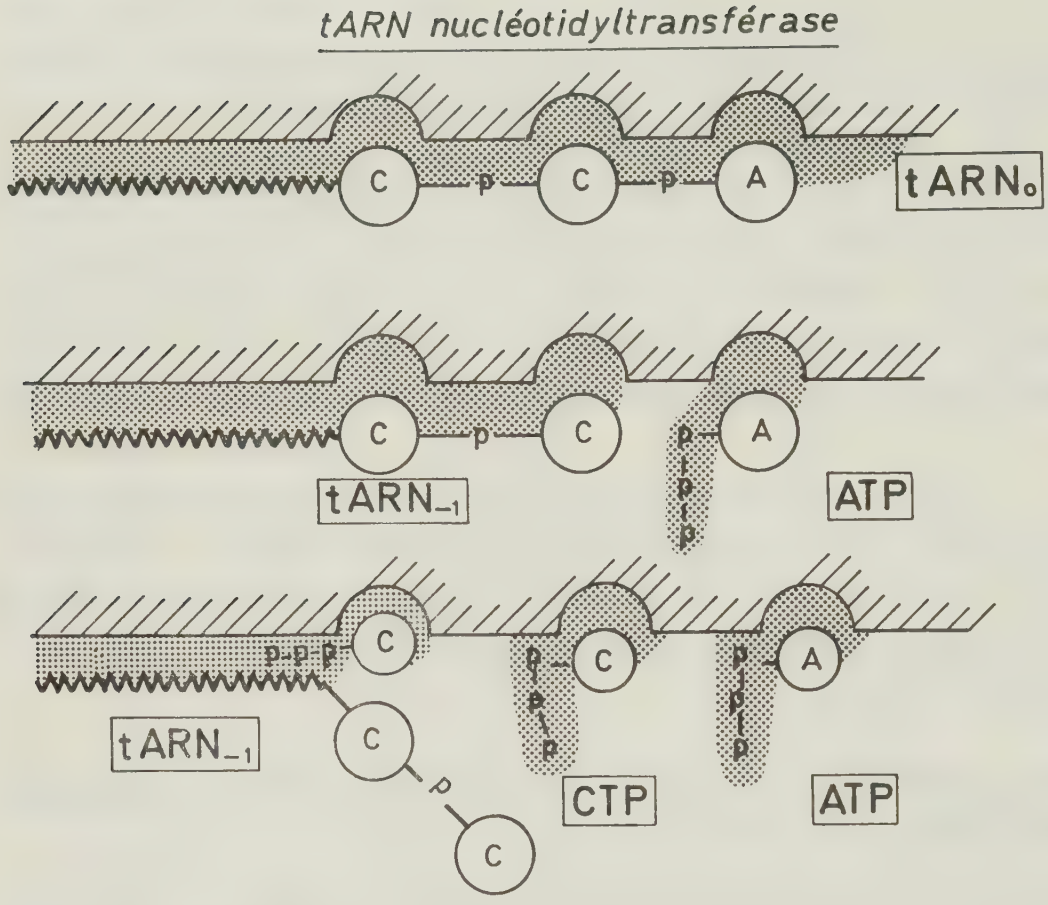


Figure 22 - Hypothèse d'une compétition entre tARN-pXpCpC et CTP au niveau des sites C de la tARN nucléotidyltransférase.

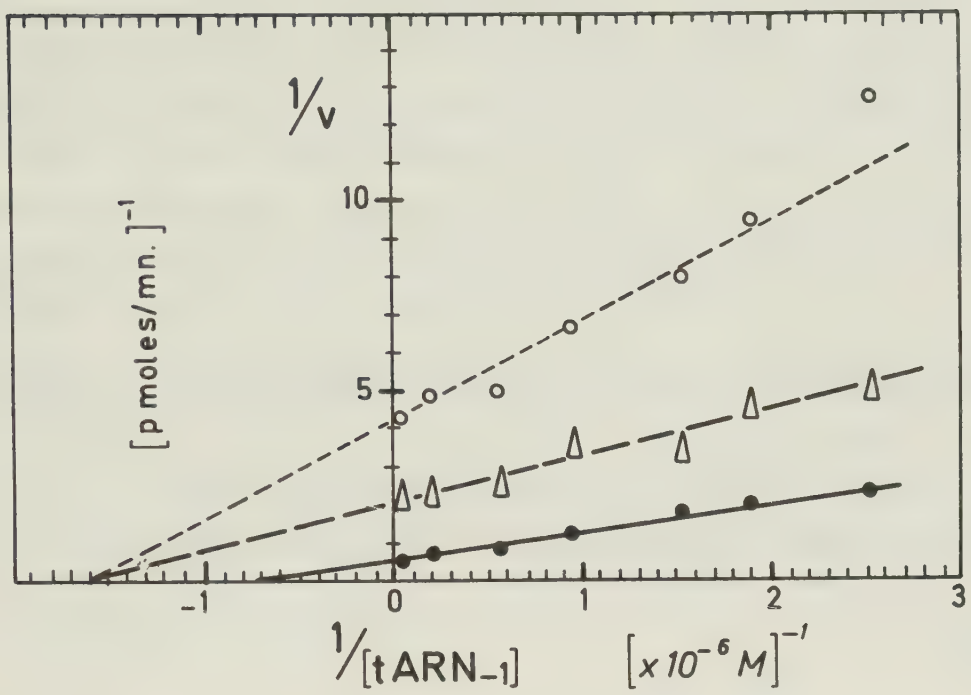


Figure 23 - Relation d'inhibition entre le CTP et le tARN -pCpC dans la réaction d'incorporation dans ce tARN.

—●— sans CTP
--Δ-- CTP 4 10^{-4}M
--o--- CTP 2 10^{-3}M
Concentration en ATP 10^{-4} M

Le pourcentage de tARN utilisé au cours de la réaction ne dépasse en aucun cas 3%.

et pour deux concentrations en ce nucléotide : 4 10^{-4} M et 2 10^{-3} M. Cette figure n'est pas celle qui correspondrait à une inhibition compétitive (intersection des trois droites sur l'axe des ordonnées) ou une inhibition non compétitive de type simple (intersection des trois droites sur l'axe des abscisses). Elle se rapproche du type incompétitif (droites parallèles) traduisant une fixation de CTP dépendante de la formation du complexe Enz-tARN. Il faut noter que, la présence dans le tARN-1 d'une faible quantité de tARN-pXpC pourrait entrainer, en présence de CTP une augmentation de la vitesse d'incorporation d'AMP (par augmentation de la concentration en substrat disponible). D'autre part, la situation est compliquée par le fait que le CTP peut être incorporé dans le tARN -pXpCpC pour donner la séquence finale -pXpCpCpC. Il serait important de savoir si la fixation d'un nucléotide sur l'enzyme -ici le CTP- est totalement indépendante de la formation du complexe Enz-tARN.

CONCLUSION

Il n'y a pas dissociation obligatoire de l'enzyme et de son substrat polynucléotidique à chaque addition de nucléotide au cours de la synthèse de la séquence -pCpCpA. Cette dissociation est cependant possible et favorisée par des concentrations limitantes en nucléotides. ATP et CTP exercent l'un envers l'autre des inhibitions de type non compétitifs, suggérant l'existence de sites différents pour ces deux nucléotides. UTP et CTP, qui présentent une inhibition de type compétitif, par contre, utilisent vraisemblablement le même site. Le tARN complet et le tARN dépourvu du résidu adenosylyl terminal sont inhibiteurs compétitifs, ce qui permet de penser que leurs sites de fixation au moins partiellement sont identiques.

B / ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE L'ENZYME ET SES SUBSTRATS

Les interactions entre la tARN nucléotidyltransférase et ses différents substrats ont été étudiées par des moyens indirects : effets de ces substrats sur : la thermodénaturation, l'action des réactifs des groupes thiols, la proteolyse.

Le complexe formé entre l'enzyme et le tARN a, par ailleurs, été isolé par centrifugation.

1 - ETUDE DE LA THERMODENATURATION DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE

La formation de complexes entre l'enzyme et ses substrats se répercute sur la conformation de l'enzyme. Cette modification peut se traduire par des différences de sensibilité à la dénaturation thermique.

a) Inactivation thermique en l'absence d'effecteur.

Deux catégories de préparations de tARN nucléotidyltransférase, quant à la stabilité thermique ont été obtenues :

- les préparations très stables, dont la demi-vie à 60° est de 10 à 20 mn ;
- les préparations instables, dont la demi-vie à 60° est environ de 1 mn et qui sont entièrement stables à 40°.

La raison de ces différences n'est pas claire et nous n'avons pu les relier d'une manière univoque ni à la technique de purification, ni au degré de pureté.

Dans tous les cas, l'inactivation thermique suit une loi d'ordre 1, au moins jusqu'à 10 % d'activité résiduelle (témoins des figures 24a et b).

La chute de l'activité d'incorporation d'AMP dans du tARN -pXpCpC et de CMP dans du tARN-pX est simultanée.

b) Comportement de la tARN nucléotidyltransférase en présence de diverses substances.

L'étude la plus étendue a été faite avec une préparation d'enzyme très stable d'activité spécifique 4800 unités par mg de proteines. Cet enzyme, à 60°, est stabilisé par son substrat, le tARN (figure 24a), mais aussi par le DNA et le poly A aux mêmes concentrations pondérales (0,65 mg/ml). Il est au contraire labilisé par l'ATP, le CTP (figure 24b) et l'UTP, mais aussi par le GTP et le dCTP qui ne sont ni substrats ni même inhibiteurs. Les diphosphates correspondants ont un effet faible et les monophosphates ou les nucléosides n'ont aucun effet (figure 24b). Ces résultats sont reportés dans le tableau 14; Les nucléotides qui produisent l'effet labilisateur ont en commun le groupe -PP, cependant une liaison phosphodiester vraie n'est pas indispensable car l'AMPPCP, qui possède un pont méthylène en position $\beta\gamma$ a le même effet que l'ATP, bien qu'il ne soit ni substrat, ni inhibiteur. Le pyrophosphate lui-même a un effet labilisateur fort.

Le tARN protège la tARN nucléotidyltransférase même sans addition de Mg^{++} et même après avoir été dialysé contre de l'EDTA (10^{-2} M pendant 1 nuit) puis débarrassé de celui-ci. Dans les mêmes conditions, la vitesse de la réaction d'incorporation d'AMP dans ce tARN est réduite à moins de 1 % de sa valeur normale. Si l'EDTA est sans effet à cet égard sur le tARN, il a par contre un effet labilisateur puissant sur l'enzyme lui-même. Cet effet n'est que partiellement réversé par dialyse et n'est pas contrebalancé par addition d'une quantité supérieure de Mg^{++} ou d'autres cations par rapport à l'EDTA. Lorsque deux effecteurs sont utilisés conjointement l'effet dépend de la concentration de chacun. Le βmercaptoéthanol ne protège pas l'enzyme contre l'inactivation thermique.

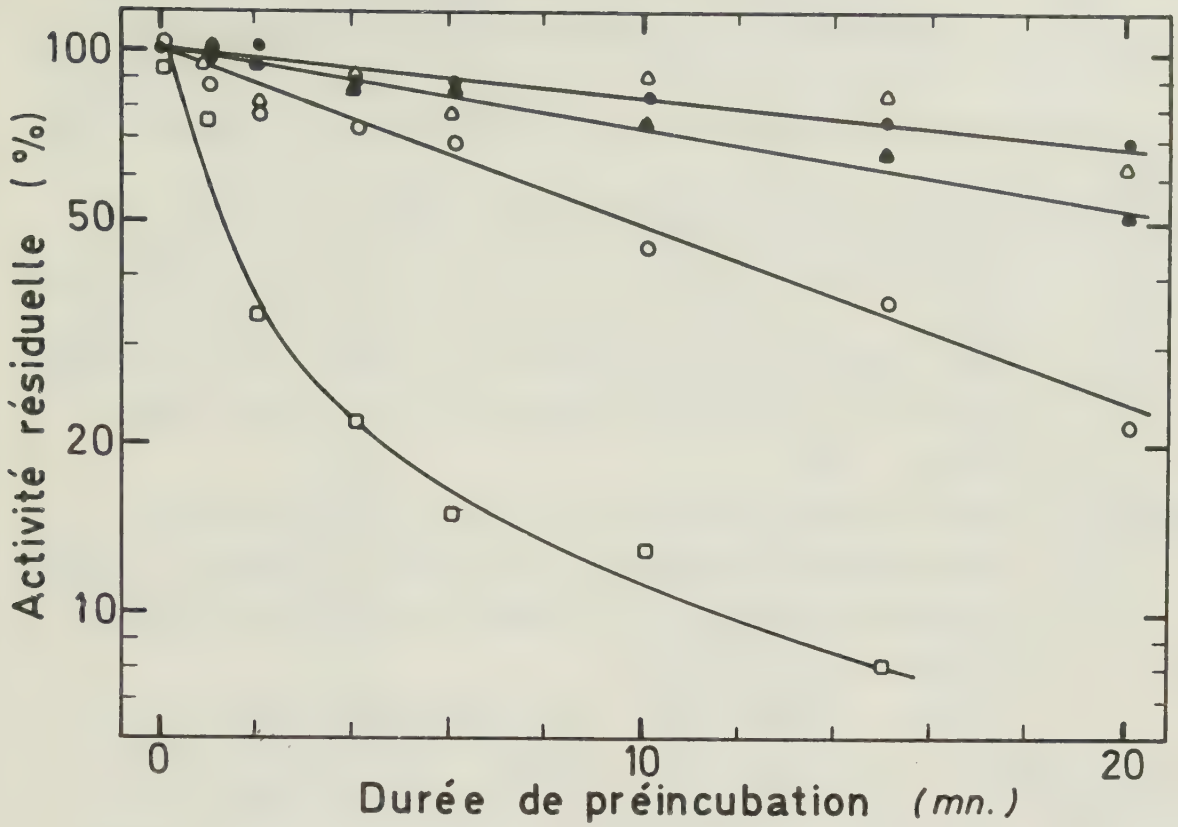


Figure 24 a

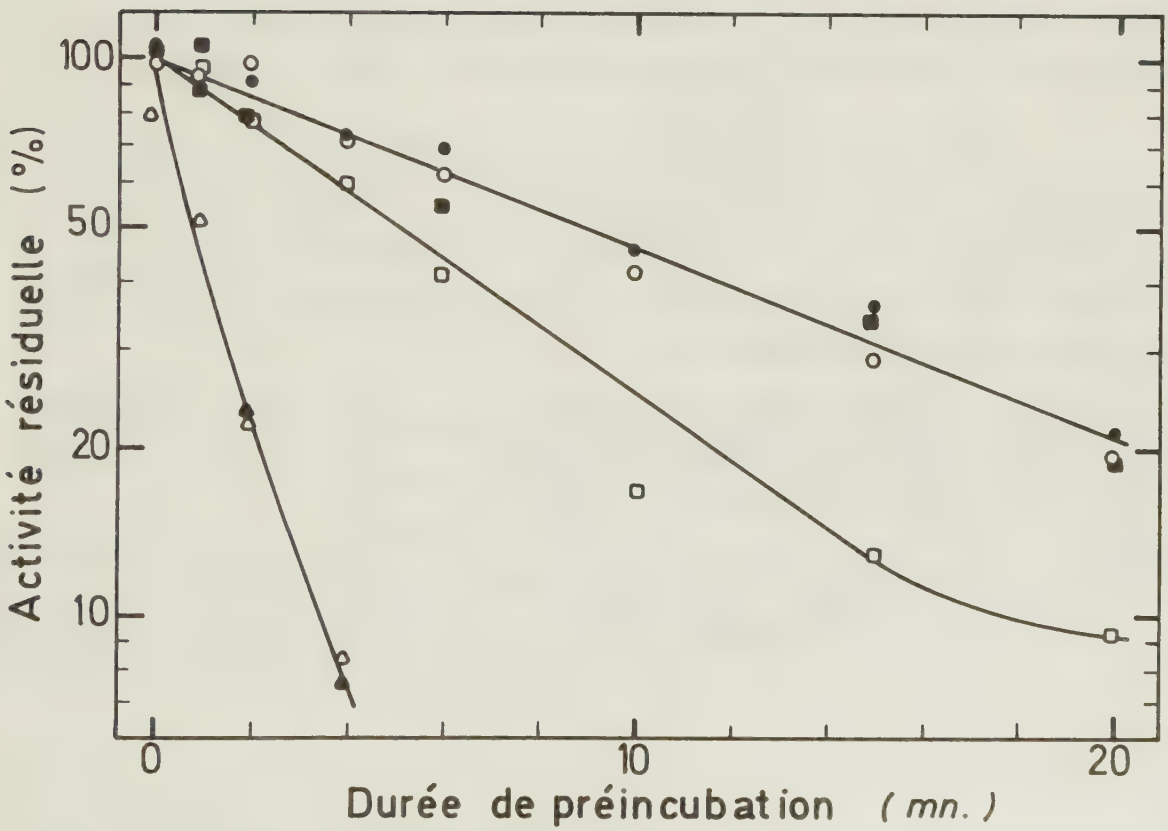


Figure 24 b

Figures 24a et b - Effet de divers effecteurs sur l'inactivation thermique de la tARN nucléotidyltransférase (enzyme stable).

La thermodénaturation a été réalisée de la manière suivante :

Mélange (1) : Dans un volume final de 2 ml : 380 unités de tARN nucléotidyltransférase, 200 µmoles de tampon Tris-HCl, pH 8,5, 60 nmoles de βmercaptoéthanol et suivant les cas les effecteurs indiqués. Lorsqu'un des effecteurs est aussi substrat il est alors omis du mélange (2).

Mélange (2) : Dans un volume final de 0,5 ml : 100 µmoles de tampon Tris-HCl, pH 8,5, 16 µmoles de $MgCl_2$, 4 µmoles de βmercaptoéthanol, 40 nmoles de tARN de levure, 200 nmoles de ^3H-ATP.

L'enzyme et les effecteurs d'une part (mélange 1), les autres réactifs d'autre part (mélange 2) sont incubés séparément à 60°. En fonction du temps des aliquotes de 200 µl du mélange (1) et 50 µl du mélange (2) sont prélevées et conservées dans la glace. L'incubation à 60° du mélange (2) a pour but d'annuler tout effet thermique sur un effecteur utilisé ultérieurement comme substrat. Il a été montré qu'elle a un effet négligeable sur les constituants du milieu (2) durant l'expérience.

L'activité enzymatique résiduelle est déterminée par incubation à 37° pendant 30 mn de 150 µl de chacune des aliquotes de (1) avec l'aliquote de 50 µl correspondante du mélange (2). Les échantillons sont ensuite traités selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes.

Figure 24 a - ○ Témoin sans effecteur
● tARN de levure (1,3 mg)
▲ ADN de thymus (1,3 mg)
△ Poly A (1,3 mg)
□ Poly C (1,3 mg)

Figure 24b - ○ Témoin sans effectuer
● Cytidine (540 nmoles)
■ 5' CMP (540 nmoles)
□ CDP (540 nmoles)
▲ CTP (540 nmoles)
△ dCTP (540 nmoles)

	Effecteur	Concentration	Demi-vie
Stabilisateurs	tARN	0,65 mg/ml	× 3 à 4
	DNA (thymus)	0,65 mg/ml	× 2
	Poly A	0,65 mg/ml	× 3 à 4
Labilisateurs	ATP	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/6
	CTP	$2,7\ 10^{-4}$ M	× 1/8 à 1/10
		$0,5\ 10^{-4}$ M	× 1/3
	UTP	$2,7\ 10^{-4}$ M	× 1/7
	GTP	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/6
	dATP	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/6
	dCTP	$2,7\ 10^{-4}$ M	× 1/10
	AMPPCP	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/6
	ADP	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/2
	CDP	$2,7\ 10^{-4}$ M	× 1/2 à 1/3
	Poly C	0,65 mg/ml	× 1/7
	Pyrophosphate	$1,3\ 10^{-4}$ M	× 1/8
	EDTA	$5\ 10^{-4}$ M	× 1/20
		$5\ 10^{-5}$ M	× 1/5
sans effet	Adenine	$1,3\ 10^{-4}$M	
	Cytosine	$2,7\ 10^{-4}$M	
	Cytidine	$2,7\ 10^{-4}$M	
	5' AMP	$1,3\ 10^{-4}$M	
	5' CMP	$2,7\ 10^{-4}$M	
	2'3' CMP	$2,7\ 10^{-4}$M	
	Mg^{++}	$1,3\ 10^{-2}$M	
	βmercapto-éthanol	10^{-2}M 10^{-3}M	

Tableau 14 - Effet de diverses substances sur l'inactivation thermique de la tARN nucléotidyltransférase (enzyme stable).
L'expérience a été réalisée dans les conditions décrites sous la figure 27.

Les préparations enzymatiques moins stables sont stabilisées par le tARN mais ne le sont pas par d'autres ARN. Ces préparations, par contre, ne sont ni sensibilisées par l'ATP ou le CTP, ni stabilisées par ces nucléotides comme c'est le cas de préparation décrites par MILLER et PHILIPPS (137). Elles restent cependant sensibles à l'action du pyrophosphate.

c) Variation de l'effet protecteur du tARN en fonction de la température.

La stabilisation de la tARN nucléotidyltransférase par le tARN a fait l'objet d'un essai d'étude quantitative. Cette étude a été réalisée avec une préparation enzymatique instable, d'une demi-vie d'une minute à 60° en l'absence d'effecteur.

Soit E la quantité totale de tARN nucléotidyltransférase. En présence de tARN une partie de cette enzyme va former un complexe Enzyme-tARN (ES), le reste demeurant libre (El).

$$El + S \rightleftharpoons ES$$

La vitesse d'inactivation de l'enzyme totale est la somme de la vitesse d'inactivation de l'enzyme libre et de l'enzyme complexée.

$$-\frac{dE}{dt} = k\,EL + k'\,ES$$

A forte concentration en tARN toute l'enzyme est sous forme de complexe E = ES

$$-\frac{dE}{dt} = k'\,E$$

En l'absence de tARN toute l'enzyme est sous forme libre E = El

$$-\frac{dE}{dt} = k\,E$$

La perte d'activité enzymatique est, à concentration saturante en tARN :

$$\frac{dE}{E} = - k' \, dt \qquad \text{soit } \mathrm{Ln}\, E = - k' \, dt + \mathrm{Ln}\, E_i$$

$$\text{ou} \quad \mathrm{Ln} \frac{E}{E_i} = - k' \, dt$$

et de même en l'absence de tARN $\mathrm{Ln} \frac{E}{E_i} = - k \, dt$

E et E_i ne sont pas directement mesurables mais sont proportionnels à l'activité de l'enzyme au temps t et au temps o

En étudiant la variation de $\mathrm{Ln} \frac{E}{E_i}$ au bout d'un temps t de préincubation, en fonction de la température de préincubation on aura la variation des constantes k' (en présence d'une concentration saturante en tARN) et k (en l'absence de tARN) avec la température. Ces constantes caractérisent le complexe Enzyme-tARN et l'enzyme libre. Leur variation avec la température est linéaire (figure 25). On n'observe pas de déviation de ces droites, même à haute température. En particulier, même à 80°, l'inactivation de l'enzyme en présence de tARN est moindre que celle de l'enzyme seul, ce qui implique que, même à cette température supérieure au T_M, le complexe demeure.

d) Variation de l'effet protecteur du tARN en fonction de sa concentration.

La vitesse d'inactivation de l'enzyme total, à une température donnée, est fonction de la proportion d'enzyme libre et complexé au tARN, c'est-à-dire fonction de la concentration en tARN.

$$- \frac{dE}{dt} = k \, El + k' \, ES$$

A 50°, le complexe est stable (pendant la durée de l'expérience) k' = 0 donc

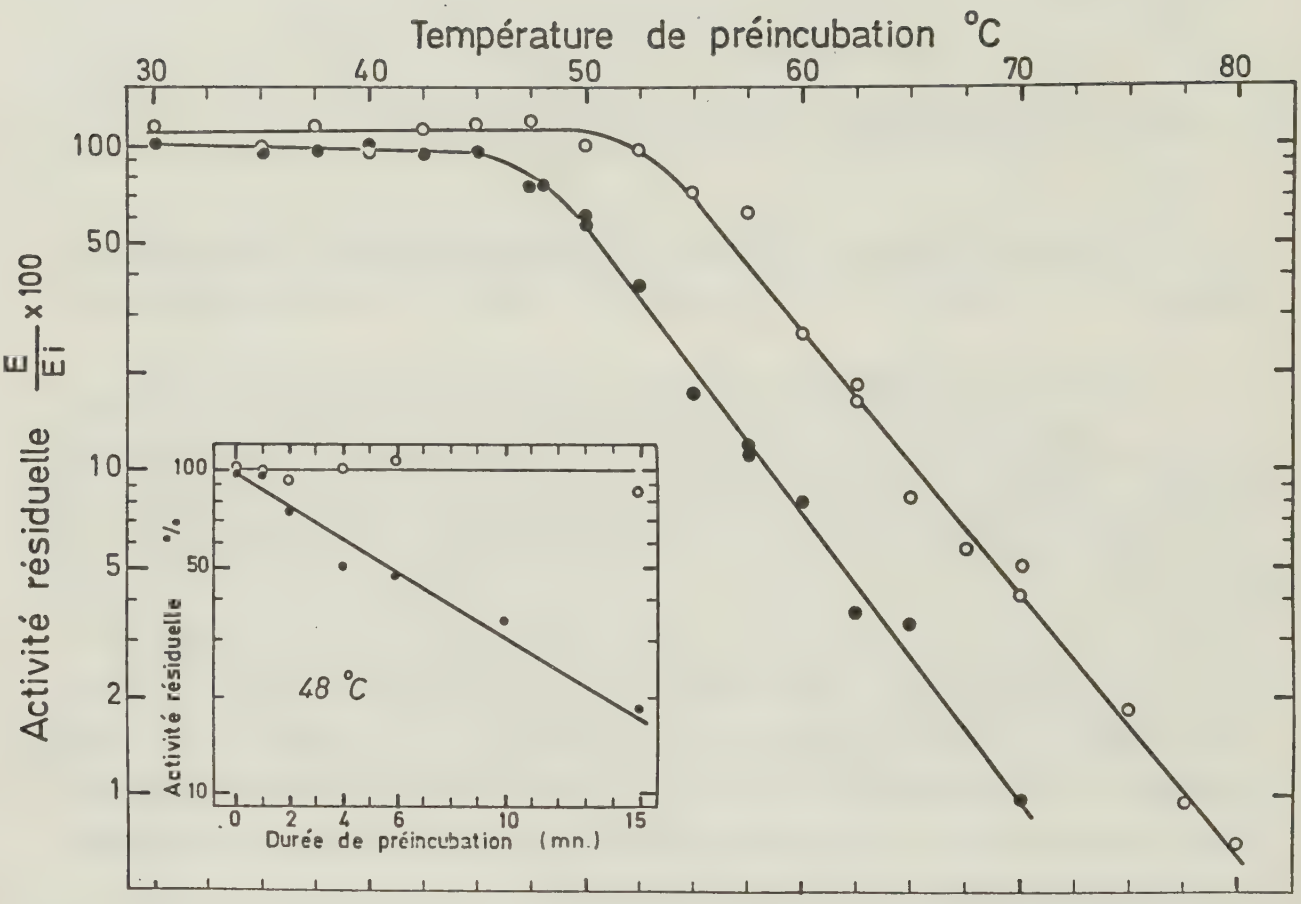


Figure 25 - Effet de la température sur l'inactivation thermique de la tARN nucléotidyltransférase (préparation instable)

●——● Enzyme seul.

o——o Enzyme + tARN de levure

Figure 25a - Cinétique d'inactivation à 48°

L'expérience a été réalisée dans des conditions voisines de celles décrites dans la légende de la figure 27.

Le mélange (1), d'un volume de 1,5 ml, renferme : 15 µmoles de Tris-HCl, pH 8,5, 1,5 µmoles de βmercaptoéthanol, 230 unités de tARN nucléotidyltransférase et dans un cas 1 mg de tARN de levure.

Le mélange (2), d'un volume de 0,5 ml, renferme : 100 µmoles de Tris-HCl, pH 8,5, 20 µmoles d'acétate de Mg, 4 µmoles de βmercaptoéthanol, 200 nmoles de ^{3}H-ATP et 1 mg de tARN de levure quand il ne figure pas dans le mélange (1).

Le mélange (1) et le mélange (2) sont préincubés à 48°, des aliquotes de 150 µl du mélange (1) et de 50 µl du mélange (2) sont prélevées au cours du temps, réunies et incubées à 37° pendant 12 mn pour la mesure de l'activité résiduelle.

Figure 25b - Variation de $\mathrm{Ln}\ \frac{E}{E_i}$ en fonction de la température de préincubation.

Les mélanges (1) et (2) ont des volumes de 100 µl et renferment chacun 1/10ème des quantités de réactifs utilisés dans les mélanges correspondants de la figure 28 a. Le mélange (1) et le mélange (2) sont préincubés à la température indiquée pendant 4 mn et l'activité résiduelle mesurée à 37° après mélange des aliquotes correspondantes de (1) et (2)

$$-\frac{dE}{dt} = k\,El = k\,(E - ES)$$

$$El + S \rightleftharpoons ES$$

$$\frac{(El)\cdot(S)}{(ES)} = K_D$$

$$\frac{(E) - (ES)}{(ES)} = \frac{K_D}{(S)} \qquad \frac{(E)}{(ES)} = \frac{K_D}{(S)} + 1 = \frac{K_D + (S)}{(S)}$$

$$\frac{(ES)}{(E)} = \frac{(S)}{K_D + (S)}$$

$$-\frac{d(E)}{dt} = k\,(E)\,\left(1 - \frac{(S)}{K_D + (S)}\right.$$

$$\frac{d(E)}{(E)} = -k\left(1 - \frac{(S)}{K_D + (S)}\right) dt$$

$$Ln(E) = -k\left(1 - \frac{(S)}{K_D + (S)}\right) t + Ln\,(E_i) \qquad ((E_i) = (E) \text{ au temps initial})$$

$$Ln\,A = Ln\,\frac{(E)}{(E_i)} = -k\left(1 - \frac{(S)}{K_D + (S)}\right) t = -k\left(\frac{K_D}{K_D + (S)}\right)t$$

En l'absence d'effecteur (S) = 0

$$Ln\,A_o = -kt$$

$$Ln\,A = Ln\,A_o\,\left(\frac{K_D}{K_D + (S)}\right.$$

$$\frac{Ln\,A_o}{Ln\,A} = 1 + \frac{(S)}{K_D}$$

La droite $\frac{Ln\,A_o}{Ln\,A} = f\,((S))$ a pour abscisse à l'origine

$(S) = -K_D$.

Ce calcul est valable si l'on peut estimer que pour toutes les concentrations en substrat (S) libre = (S) total, c'est-à-dire que la molarité en enzyme doit être faible devant la molarité en tARN. Dans l'expérience présentée dans la figure nous avons utilisé 23 unités de tARN nucléotidyltransférase soit, compte tenu de l'activité spécifique minimum déterminée (10^6 unités par mg de proteines), au plus 0,6 pmoles de cet enzyme et 7,6 pmoles de tARN soit un rapport $\frac{\text{tARN total}}{\text{tARN - Enz}} > 12$.

L'approximation est donc au plus de 8 % environ.

La figure 26 montre la relation $\frac{\text{Ln A}}{\text{Ln A}_o} = f([\text{tARN}])$ pour du tARN de E. coli non traité (-pXpCpCpA), en présence de Mg^{++} 10^{-3} M, à 50° C. La constante de dissociation du complexe Enzyme-tARN ainsi déterminée est de 3.10^{-7} M, ce qui concorde assez bien avec la valeur du Ki qui est de $9\ 10^{-7}$ M à 37°, à l'égard du tARN-pXpCpC. Le tARN de levure (non traité) et le tARN de E. coli-pX (préparé par action de la phosphodiestérase de venin) donnent des valeurs du même ordre de grandeur.

DISCUSSION

La relative stabilité de certaines préparations de tARN nucléotidyltransférase peut être imputée à la présence d'un élément stabilisateur qui n'est pas du tARN. Dans une telle hypothèse, l'effet labilisateur des nucléosides triphosphate et du pyrophosphate pourrait s'expliquer par un déplacement de ce facteur, laissant l'enzyme sous une forme sensible à l'inactivation thermique. L'effet de l'EDTA, molécule très négativement chargée également, pourrait s'expliquer de la même façon. Cependant, la réversion partielle de son effet par dialyse contre un tampon dépourvu de ce réactif est difficilement explicable par la seule hypothèse précédente.

Inversement, on peut supposer que la forme de l'enzyme sensible à la dénaturation thermique résulte d'une modification

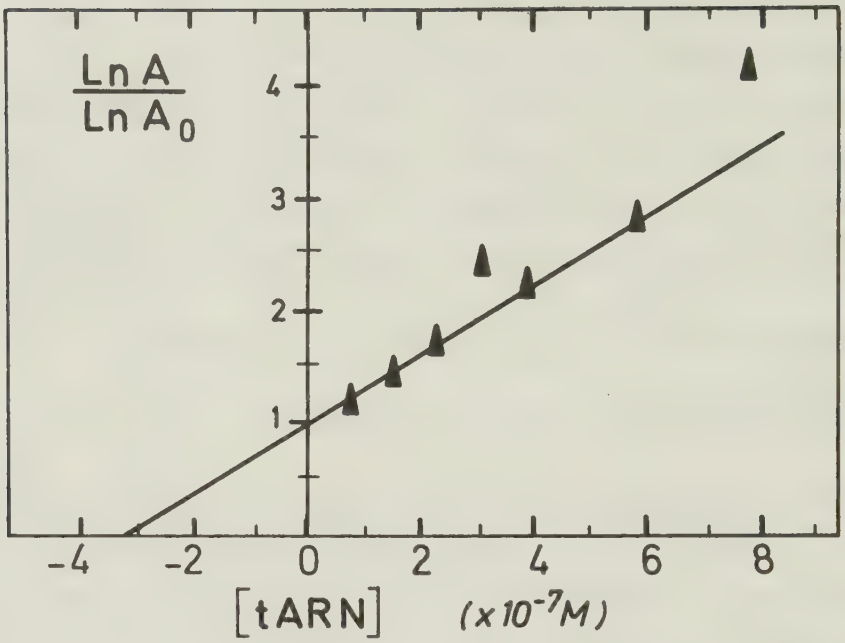


Figure 26 - Effet de la concentration en tARN de E. coli sur la tARN nucléotidyltransférase contre l'inactivation thermique.

Le mélange (1) renferme, dans un volume de 100 µl : 1 µmole de Tris-HCl, pH 8,5, 0,1 µmole d'acétate de Mg, 10 nmoles de βmercaptoéthanol, 23 unités de tARN nucléotidyltransférase et les quantités de tARN de E. coli (non traité) indiquées dans la figure.
Le mélange (2) renferme dans un volume de 150 µl : 15 µmoles de Tris-HCl, pH 8,5, 3 µmoles d'acétate de Mg, 0,6 µmoles de βmercaptoéthanol, 30 nm moles de ^{3}H-ATP, 150 µg de tARN de levure et des quantités de tARN de E. coli telles que sa concentration soit la même dans tous les tests d'activité.
Après 1 mn à 37° les mélanges (1) et (2) sont préincubés 3 mn à 50° puis placés dans la glace. Une aliquote de 100 µl du mélange (2) est ajoutée au mélange (1) correspondant et la mesure de l'activité enzymatique résiduelle est faite par incubation à 37° pendant 20 mn. L'activité enzymatique initiale est déterminée sur un échantillon non préincubé à 50°.

de l'enzyme, proteolyse par exemple et que dans ces conditions l'effet labilisateur des nucléotides triphosphates ne se manifeste pas car l'enzyme se trouve déjà sous sa forme la plus instable.

L'effet protecteur analogue à celui du tARN exercé par l'ADN et le poly A et l'effet opposé du poly C sont assez surprenante dans la mesure où ces polymères ne sont ni substrat ni inhibiteur de la tARN nucléotidyltransférase et où aucun complexe entre eux et l'enzyme n'a pu être mis en évidence par centrifugation en gradient de glycerol. Il s'agit ici d'interactions non spécifiques faibles.

La différence entre les constantes d'inactivation de l'enzyme seul et en présence de tARN à une température supérieure au Tm de ce tARN dans le même milieu salin, montre que le complexe Enzyme-tARN n'est pas dissocié dans ces conditions. Ceci implique que, si l'activité de la tARN nucléotidyltransférase est nulle avec un tARN dépourvu de structure secondaire (130) le maintien du complexe Enzyme-tARN n'est pas affecté par la fusion du tARN et que peut être la tARN nucléotidyltransférase contribue au maintien de la structure secondaire de celui-ci à des températures où, en solution, elle serait détruite.

Les constantes de dissociation du complexe Enzyme-tARN déterminées par l'effet protecteur de ce substrat sur l'inactivation thermique de la tARN nucléotidyltransférase sont de l'ordre de grandeur des constantes de Michaelis apparentes ou des constantes d'inhibition des mêmes tARN, déterminées à partir de données cinétiques. Cela permet de penser que le complexe observé (en présence de Mg^{++}) est analogue au complexe fonctionnel caractérisé par les mesures cinétiques.

Alors que la plus grande partie de ces expériences était faite, une étude de MILLER et PHILLIPS sur le même sujet a paru (137). Leurs résultats sont en de nombreux points en contradiction avec les nôtres. Leur enzyme, très instable (demi-

vie de 9mn à 45°), est stabilisé par l'ATP et le CTP, ainsi que par le tARN et le Mg^{++}. Le poly A n'est pas protecteur. Les raisons de ces différences nous sont inconnues.

2 - PROTECTION DE LA tARN NUCLEOTIDYLTRANSFERASE CONTRE LA PROTEOLYSE PAR SES SUBSTRATS.

L'inactivation de la tARN nucléotidyltransférase par digestion trypsique est représentée figure 27. Le tARN protège l'enzyme contre cette dégradation, l'ATP exerce également un très faible effet protecteur.

Inversement, dans le complexe, le tARN est partiellement protégé par la tARN nucléotidyltransférase contre l'attaque de la RNAase pancréatique.

3 - ROLE DES GROUPEMENTS SH DANS L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

a) Effet des agents réducteurs.

Nous avons observé qu'au cours de la purification de la tARN nucléotidyltransférase l'addition de thiols était nécessaire pour préserver l'activité enzymatique. Lorsque l'enzyme purifié est débarrassé du βmercaptoéthanol, son activité mesurée en l'absence de cet agent est faible vis à vis de l'addition d'AMP au tARN -pXpCpC. L'addition de βmercaptoéthanol ou de dithiothreitol stimule fortement cette addition (Figure 28a) L'activité de l'enzyme dans l'incorporation de CMP n'est pas modifiée de façon sensible par ces deux mercaptans.(Figure 28b)

La stimulation maximum par le βmercaptoéthanol est observée à des concentrations relativement élevées, de l'ordre de 10^{-1} M. On ne peut pas exclure qu'à cette concentration le βmercaptoéthanol joue aussi un autre rôle que celui d'agent réducteur des ponts disulfures. Toutefois, à 10^{-2}M, la stimulation est déjà importante et elle ne peut être due qu'à cette première propriété.

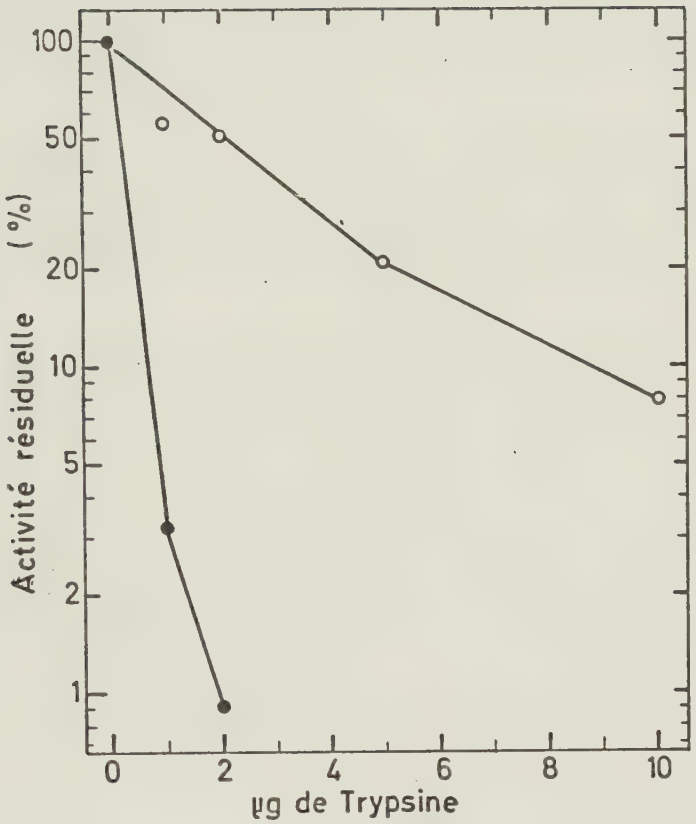


Figure 27 - Effet de la trypsine sur la tARN nucléotidyltransférase.

54 unités de tARN nucléotidyltransférase sont incubées 10 mn à 37° dans un volume de 200 µl avec 2 µmoles de Tris-HCl, pH 8,5, 200 nmoles de βmercaptoéthanol, en présence ou en l'absence de 150 µg de tARN de levure, avec des quantités croissantes de trypsine. La digestion est interrompue par addition d'un excès d'inhibiteur de la trypsine extrait de soja (0-20 µg).

L'activité résiduelle de la tARN nucléotidyltransférase est mesurée dans les conditions standards.

- ● enzyme seule.
- ○ enzyme + tARN.

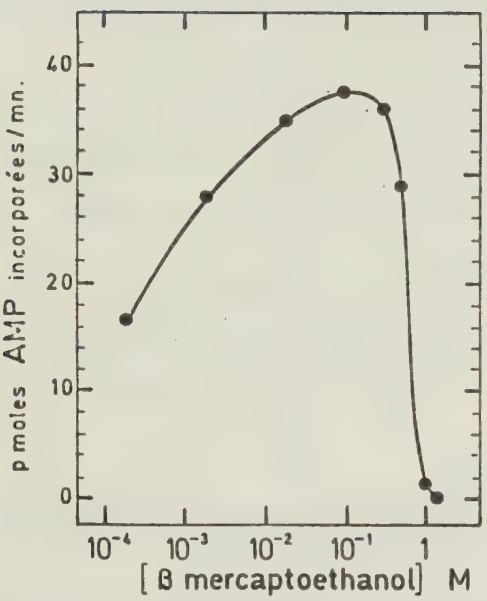


Figure 28 a

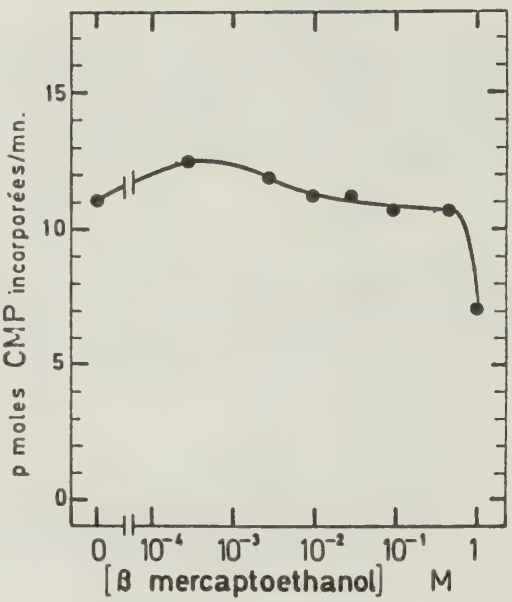


Figure 28 b

Figure 28 - Effet du βmercaptoéthanol sur l'activité de la tARN nucléotidyltransférase.

Figure 28a - Activité d'incorporation d'AMP dans du tARN de levure (tARN-1).

Figure 28b - Activité d'incorporation de CMP dans du tARN de E. coli (tARN-pX)

b) Effet des réactifs des thiols.

Pour l'étude du rôle des groupements thiols dans l'activité de la tARN nucléotidyltransférase deux réactifs de ces groupes ont été utilisés : le DTNB et la NEM.

L'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoique) (DTNB) réagit avec les SH libres de proteines pour former des disulfides mixtes. Cette réaction peut être réversée par un excès de βmercaptoéthanol.

La réaction avec la N-éthyl maléimide (NEM) correspond à une alkylation. Cette liaison est insensible à l'action du βmercaptoéthanol. On peut donc interrompre la réaction de la NEM sur un enzyme en neutralisant la NEM qui n'a pas réagi par addition de βmercaptoéthanol sans réverser le blocage des groupes enzymatiques, et mesurer ultérieurement l'activité résiduelle.

α) Réduction de la tARN nucléotidyltransférase.

La réduction des préparations enzymatiques en solution tampon : glycérol (1:1) est obtenue par addition de βmercaptoéthanol à la concentration 0,05 M. Les solutions conservées à -20° dans ces conditions pendant 12 à 16 heures sont ensuite débarrassées du mercaptan par filtration sur colonne de Sephadex G-25. L'enzyme ainsi préparé est conservé sous azote. La réduction est en général assez bonne si l'enzyme est utilisé immédiatement après filtration. Son activité est seulement 2 à 5 % plus faible en l'absence de βmercaptoéthanol qu'en sa présence. Cependant la conservation prolongée, même sous azote, conduit à une lente oxydation de l'enzyme et après quelques jours on constate une diminution de l'activité qui peut dépasser 30 %.

β) Effet de l'addition de DTNB au milieu réactionnel.

Les premières expériences ont été faites en ajoutant

le DTNB au milieu réactionnel et en mesurant l'incorporation des nucléotides au bout de 30 mn d'incubation. Comme le montre la figure 29 une diminution importante de l'activité enzymatique se produit dans une gamme de concentrations assez étroite. Aux concentrations les plus faibles en DTNB l'action de ce réactif n'étant pas immédiate, l'effet en sera sous estimé. Une inhibition de 50 % de l'effet maximum est obtenue avec une concentration en réactif voisine de 0,3 µM. Aux plus fortes concentrations en réactif l'activité atteint un palier de 21 %. Ce palier peut représenter soit l'activité de la fraction de molécules oxydées présentes dans la préparation enzymatique et ne pouvant réagir avec le DTNB, soit une certaine proportion d'enzyme protégée par la présence des substrats, soit l'activité intrinsèque du complexe Enzyme-DTNB. La seconde hypothèse peut être éliminée car une préincubation de l'enzyme pendant 3 heures avec du DTNB 8,7 mM en l'absence de substrats n'abaisse pas la valeur de l'activité résiduelle. Par ailleurs, on ne peut rendre compte de l'activité insensible au DTNB par l'activité de la fraction de molécules oxydées présentes dans la préparation enzymatique. L'activité enzymatique de la préparation utilisée en l'absence de βmercaptoéthanol est 98 % de ce qu'elle est en sa présence (Tableau 15).

On constate par ailleurs dans ce tableau que l'inhibition par le DTNB est entièrement levée par addition d'un excès de βmercaptoéthanol. Par conséquent, à la concentration en DTNB utilisée du moins, il s'agit uniquement d'une réaction d'oxydoréduction au niveau des thiols, sans effets secondaires sur d'autres acides aminés.

Dans ce même tableau, si l'on suit l'activité d'incorporation de CMP dans du tARN-pXpC, on constate qu'il n'y a aucune inhibition pour une concentration en DTNB pourtant plus élevée. Il en est de même pour l'incorporation de CMP dans le

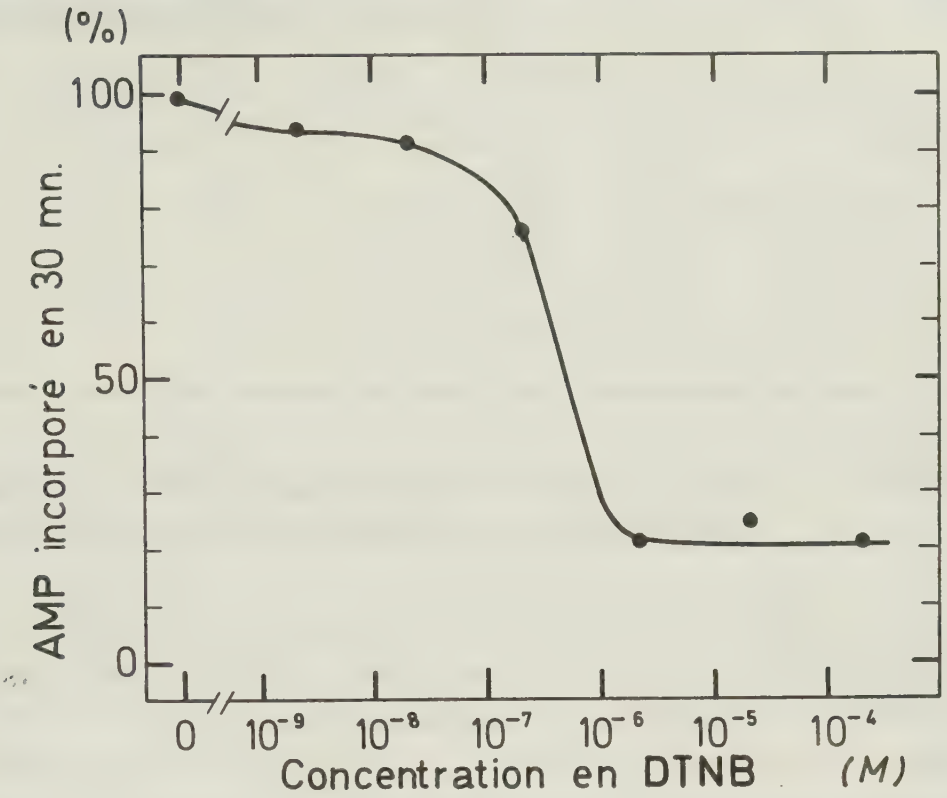


Figure 29 - Effet de l'addition de DNTB dans le mélange réactionnel sur l'incorporation d'AMP dans du tARN-pXpCpC.

Le milieu réactionnel renferme, dans un volume de 200 µl, outre Tris et acétate de Mg^{++} aux concentrations habituelles, 180 µg de tARN de levure, 20 nmoles d'ATP, du DTNB aux concentrations indiquées. La réaction est démarrée par addition de 16 unités de tARN nucléotidyltransférase réduite. L'incubation, à 37°, dure 30 mn.

DTNB	βmercapt.	Activité incorp. AMP (pmoles/ 30 mn)	Activité incorp. CMP (pmoles / 30 mn)
-	-	454	690
-	+	466	-
+	-	116	700
+	+	484	-

Tableau 15 - Effet de la présence de DTNB dans le milieu réactionnel sur l'incorporation d'AMP et de CMP.

Le milieu réactionnel pour l'incorporation d'AMP est analogue à celui de l'expérience décrite dans la figure 29 Le DTNB est utilisé à la concentration 2,25 µM et le βmercapto-éthanol à la concentration 1,3 mM. Pour l'incorporation de CMP le milieu renferme 103 µg de tARN de E. coli $_{-2}$, 20 nmoles de ^{3}H-CTP et 16 unités de tARN nucléotidyltransférase. Le DTNB est utilisé à la concentration 6,5 M.

---

tARN-pX. Le CTP, dans cet essai, à la concentration 10^{-4} M, est largement saturant, alors que l'ATP, à la même concentration ne l'est pas. Ceci pourrait avoir deux effets : d'une part une protection plus grande des sites impliqués dans l'incorporation de CMP à l'égard du DTNB et d'autre part le masquage d'une inhibition qui n'affecterait que le K_M. Ces deux possibilités ont été écartées, les résultats étant les mêmes lorsque l'enzyme est traité par le DTNB en l'absence de CTP et d'autre part lorsque la mesure de l'activité résiduelle est effectuée en présence d'une concentration en CTP inférieure au K_M.

γ) Effet de la N-éthyl maléimide sur les diverses activités de la tARN nucléotidyltransférase.

L'effet d'une préincubation de l'enzyme réduit avec la NEM, est analogue à celui observé pour le DTNB. La moitié de l'inhibition maximum est obtenue pour une concentration de $3\ 10^{-6}$ M environ au cours d'une préincubation de 15 mn à 22°. Un palier est atteint pour des concentrations en réactif comprises entre 10^{-5} et 10^{-3}M. Au-delà, une nouvelle chute d'activité correspond probablement à des réactions secondaires de la NEM sur des acides aminés autres que la cystéine. La signification du palier, dans le cas de l'action de la NEM est différente de ce qu'elle est pour le DTNB. En effet, comme la mesure de l'activité résiduelle est réalisée en présence de β mercaptoéthanol, les molécules d'enzyme oxydées, insensibles à l'action de la NEM vont être réduites et participeront à l'activité enzymatique.

Le tableau 16 montre l'inhibition de l'incorporation d'AMP, de CMP et d'UMP dans le tARN-pX par rapport à l'inhibition de l'incorporation d'AMP au tARN-pXpCpC.

On note que, comme dans le cas du DTNB l'inhibition de l'incorporation de CMP est plus faible que celle d'AMP dans la séquence -pCpCpA. Certaines préparations enzymatiques sont mêmes totalement insensibles à des concentrations en NEM allant jusqu'à $2\ 10^{-4}$ M, pour lesquelles l'effet sur l'incorporation d'AMP est instantané. L'incorporation d'UMP est également peu inhibée. Plus surprenant est le fait que l'incorporation d'AMP dans le tARN-pX n'est aussi que peu affectée. Ce dernier résultat suggère que le site impliqué dans cette incorporation pourrait être celui du CMP et non le site normal qui permet l'incorporation d'AMP dans du tARN-pXpCpC.

Nucléotide incorp.	tARN	Inhibition (%)
AMP	-pXpCpC	100
AMP	-pX	29
CMP	-pX	37
UMP	-pX	29

Tableau 16 - Effet de la NEM sur l'activité de la tARN nucléotidyltransférase.

250 µl de Tris-HCl 10^{-2}M, pH 8,5 renfermant 3,5 unités de tARN nucléotidyltransférase et 4,5 nmoles de NEM sont préincubés à 24°. Au bout de 30 mn 250 µl de βmercapto-éthanol 3 10^{-2} M sont ajoutés et le milieu maintenu 15 mn à 0°.

L'activité enzymatique résiduelle est mesurée sur des aliquotes de 100 µl dans les conditions standards, avec 20 nmoles de ^{3}H-ATP, -CTP ou -UTP et 6 nmoles de tARN de levure (-pXpCpC) ou 9 nmoles de tARN de E. coli -pX (préparé par oxydation periodique). La mesure de l'incorporation d'UMP est faite en présence de Mg^{++} 10^{-2} M et de Mn^{++} 2 10^{-4} M.

Les inhibitions sont exprimées par rapport à celle observée pour l'incorporation d'AMP dans le tARN -pXpCpC.

δ) Effet des substrats sur l'action des réactifs des SH.

Effet des nucléotides

La figure 30 montre l'effet de l'ATP et du CTP 10^{-3} M sur l'inactivation de la tARN nucléotidyltransférase au cours d'une préincubation avec du DTNB 6,5 µM. On mesure l'activité résiduelle d'incorporation d'AMP dans du tARN de levure (en présence de sérum albumine). On constate que l'ATP, à cette concentration saturante, protège totalement l'enzyme contre l'inactivation ; par contre, le CTP n'exerce pas de protection. On a montré par ailleurs que l'activité d'incorporation de CMP n'est pas affectée par la présence d'ATP au cours de la préincubation. En ce qui concerne l'inactivation par la NEM, l'effet de l'ATP et du CTP est qualitativement le même qu'avec le DTNB.

Effet des acides nucléiques.

L'effet protecteur des ARN a été suivi dans des conditions analogues. Le tableau 17 montre l'effet d'une préincubation de l'enzyme avec du DTNB en présence de tARN de séquence finale plus ou moins dégradée sur l'incorporation d'AMP dans du tARN-pXpCpC.

La protection exercée par les tARN utilisés décroit avec le degré de dégradation de leur séquence terminale -pXpCpCpA. l'ARN ribosomal n'exerce pas de protection.

CONCLUSION

Les diverses activités de la tARN nucléotidyltransférase sont différemment affectées par l'action des agents réducteurs et des réactifs des SH. L'incorporation d'AMP dans

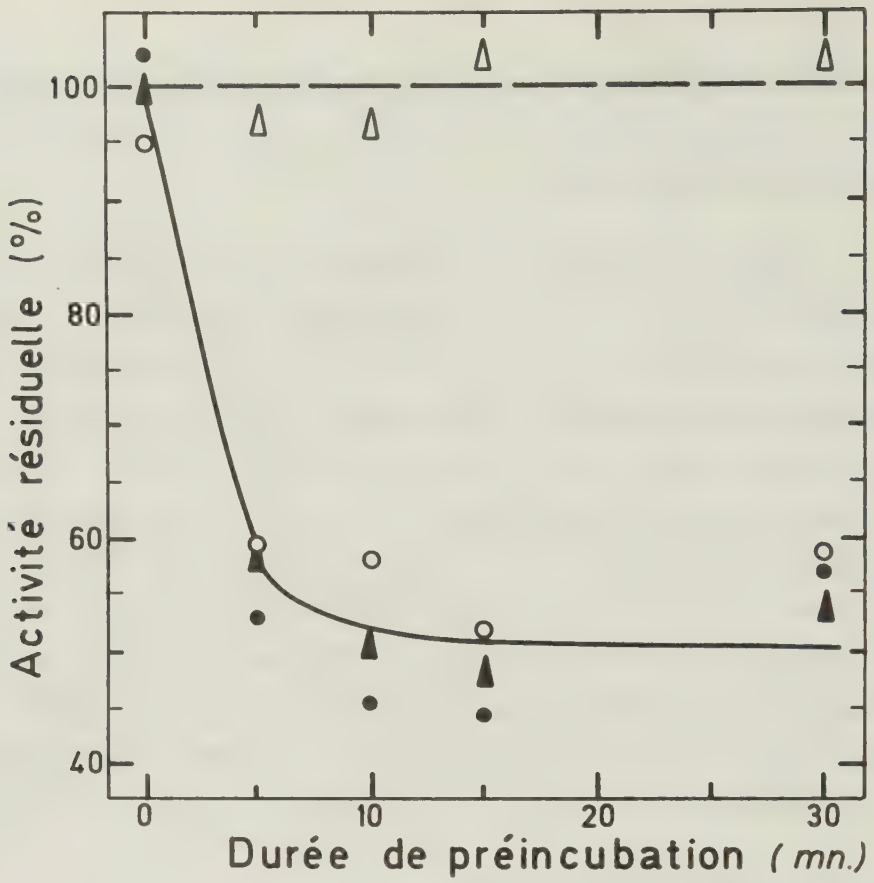


Figure 30 - Effet de l'ATP et du CTP sur l'inactivation de la tARN nucléotidyltransférase par le DTNB.

L'enzyme est d'abord préincubé à 0° pendant 2 mn dans un milieu (200 µl) renfermant 1 µmole de Tris-HCl, pH 8,5 et selon les cas 200 nmoles de ^{3}H-ATP, 200 nmoles de CTP, ou aucun nucléotide.

Puis on ajoute 1,3 nmoles de DTNB et on préincube à 37°.

Au cours du temps des aliquotes de 20 µl sont prélevées pour mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme par incubation à 37° pendant 15 mn en présence de Tris-HCl, pH 8,5, acétate de Mg, 6 nmoles de tARN de levure, 200 µg de sérum albumine, 20 nmoles de ^{3}H-ATP lorsqu'il n'était pas présent lors de la préincubation, 20 nmoles de CTP dans l'expérience témoins de l'effet de ce nucléotide et de 1 µmole de βmercaptoéthanol ou sans βmercaptoéthanol. La sérum albumine est ajoutée afin de minimiser les effets du DTNB durant la mesure de l'activité résiduelle.

Les valeurs sont exprimées par rapport à l'activité des témoins ou l'action du DTNB est réversée par le βmercaptoéthanol.

Δ Préincubation avec ATP
o Préincubation avec CTP.
▲ ● Préincubation sans nucléotides.

ARN ajouté	Inhibition (%)
rien	100
rARN	102
tARN-pX	89
tARN-pXpCpC	82
tARN-pXpCpCpA	61

Tableau 17 - Effet des acides nucléiques sur l'inactivation de la tARN nucléotidyltransférase par le DTNB.

Préincubation à 37° (pH 8,5) de tARN nucléotidyltransférase, pendant 10 mn en présence de DTNB 6,5 µM et selon les cas :

tARN de E. coli -pXpCpCpA (non traité) 55,8 µg
tARN de E. coli-pXpCpC (préparé par oxydation periodique) 55,8 µg.
tARN de E. coli-pX (préparé par oxydation periodique) 58,5 µg.
rARN de E. coli (16 et 23 S) 57,0 µg.

Le volume réactionnel est de 200 µl.

Mesure de l'activité résiduelle d'incorporation d'AMP : des aliquotes de 20 µl sont prélevées et ajoutées à un mélange renfermant, dans un volume de 200 µl, outre le tampon et l'acétate de Mg, 150 µg de tARN de levure, 20 nmoles de ^{3}H-ATP et 200 µg de sérum albumine. Incubation 15 mn à 37°.

Les pourcentages d'inhibition sont rapportés à l'inhibition observée en l'absence d'ARN.

la séquence normale des tARN est très affectée, tant par l'oxydation que par le blocage des groupes SH. Celle de CMP est peu touchée. Ceci indique que la structure des sites impliqués dans ces deux réactions est, au moins partiellement différente. Seule l'activité d'incorporation d'AMP met donc en jeu un ou plusieurs groupes SH très réactifs.

L'activité d'incorporation d'UMP se comporte à l'égard des réactifs des SH comme celle de CTP, ce qui suggère que le site impliqué dans l'utilisation de ce nucléotide est celui du CTP.

Le cas de l'incorporation d'AMP dans le tARN-pX est surprenant. Cette activité elle aussi, est peu affectée par la NEM, contrairement à l'activité d'incorporation du même nucléotide dans le tARN-pXpCpC. Le site CTP serait donc impliqué aussi dans cette réaction.

Le fait que l'ATP et le tARN-pXpCpCpA protègent bien l'enzyme contre les réactifs des SH, alors que les tARN-pX et -pXpCpC le protègent beaucoup moins, peut signifier que le groupement SH réactif se situe au niveau du site correspondant au dernier nucléotide du tARN.

La protection par l'ATP constitue une bonne preuve de la formation d'un complexe entre ce nucléotide et l'enzyme en l'absence de tARN.

L'ensemble des hypothèses émises dans cette partie du travail concernant la spécificité des divers sites impliqués dans la réaction enzymatique repose sur la détermination des activités enzymatiques et non pas sur des titrations directes. Pour effectuer de telles titrations des quantités importantes d'enzyme doivent être préparées.

4 - MISE EN EVIDENCE DU COMPLEXE ENZYME-tARN PAR CENTRIFUGATION

RESULTATS

L'isolement de complexes entre la tARN nucléotidyltranférase et le tARN a été réalisé par centrifugation en gradient de saccharose ou de glycérol (140).

L'enzyme seul, en présence ou en l'absence de Mg^{++}, a une constante de sédimentation de 3,4 S (déterminée par rapport à l'hémoglobine de lapin 4,2 S). L'application de la formule de MARTIN et AMES (82) $S_1/S_2 = (M_1/M_2)^{2/3}$, donne un poids moléculaire de 45 000 $\pm$ 3 000 daltons.

Lorsque l'enzyme est centrifugé en présence de tARN on observe un déplacement du pic d'activité enzymatique qui sédimente alors avec une constante de 5,3 S (par rapport à l'hémoglobine). Si l'on suppose la conformation et la densité du complexe et de l'enzyme libre identiques cette valeur correspondrait à un poids moléculaire de 90 000 (valeur par excès étant donnée la présence de tARN dans le complexe). Cette valeur est compatible avec la formation d'un complexe 1:1 entre l'enzyme et le tARN. La formation du complexe, en présence de Mg^{++} est très efficace, comme le montre la figure 31a. Lorsque l'enzyme est sédimenté dans un gradient de glycérol renfermant de manière homogène du tARN la migration est identique, prouvant que le complexe ici observé représente l'enzyme saturé en tARN. Par contre, en l'absence de Mg^{++}, le complexe formé est moins stable (figure 31b). Avec 3 µg de tARN il se dissocie au cours de la centrifugation. Un profil tout à fait analogue a été obtenu avec du tARN préalablement dialysé contre de l'EDTA. Le complexe Enzyme-tARN est dissocié par les sels à forte concentration (KCl 0,4 M). Cette observation permet d'expliquer l'effet inhibiteur du KCl à cette concentration sur toutes les activités de la tARN nucléotidyltransférase.

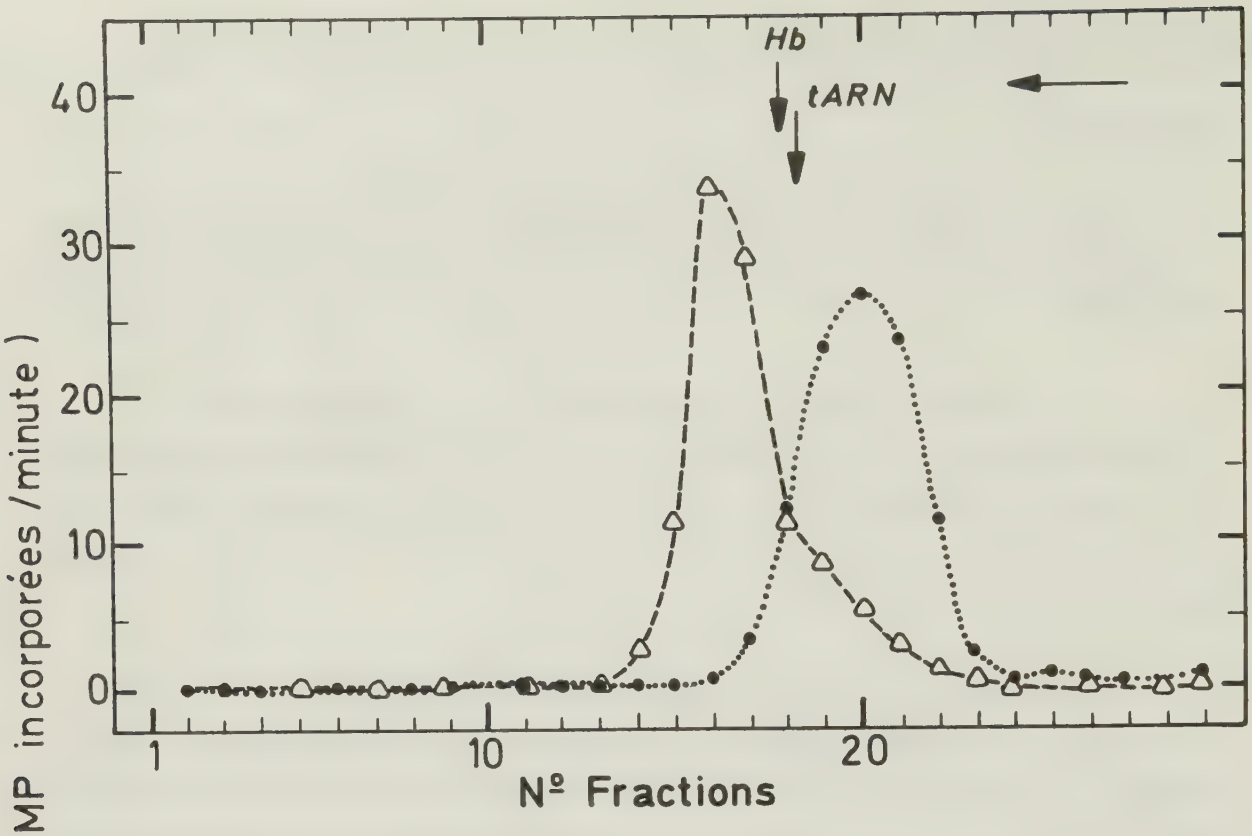


Figure 31a

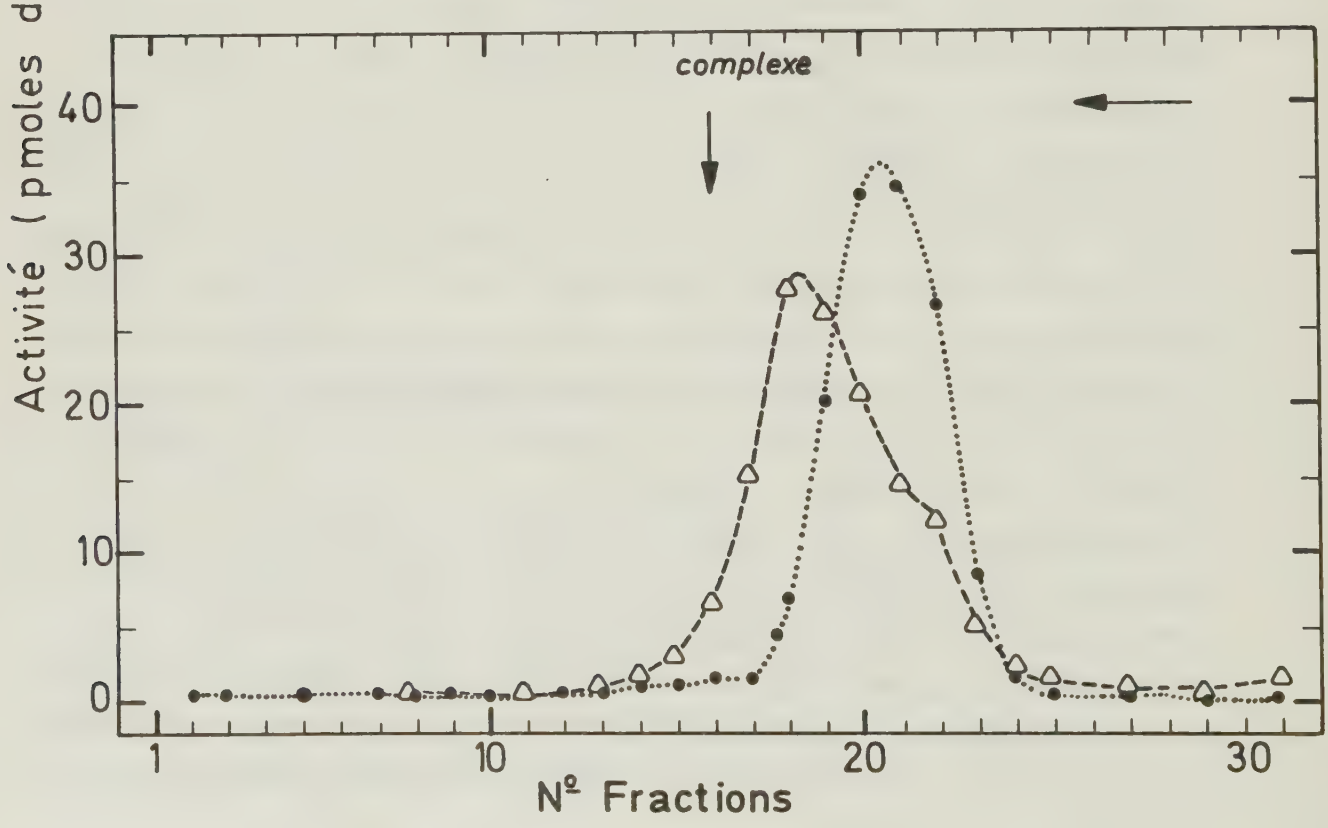


Figure 31b

Figure 31a - Centrifugation de la tARN nucléotidyltransférase en présence de Mg^{++}.

Une solution de tARN nucléotidyltransférase dans du tampon Tris-HCl 10^{-2} M, pH 8,5, acétate de Mg^{++} 10^{-2} M, βmercaptoéthanol 5 10^{-3} M est centrifugée en présence de 3 µg de tARN de E. coli ou sans tARN dans un gradient de glycérol (10 - 30 %) dans le même tampon, pendant 41 heures à 40 000 rpm dans le rotor Spinco SW 41 à -5°.

L'enzyme est localisée par son activité déterminée dans les conditions standards sur des aliquotes de 25 µl de chaque fraction.

Figure 31b - Centrifugation de la tARN nucléotidyltransférase en l'absence de Mg^{++}.

Les conditions sont les mêmes à la différence que les tampons ne renferment pas d'acétate de Mg^{++}.

●---● enzyme seule.
△---△ enzyme + 3µg de tARN de E. coli.

La présence d'EDTA empèche totalement la formation du complexe. Ceci peut être dû à la soustraction totale de l'enzyme des ions Mg^{++}. Il se peut en effet que l'enzyme dialysé contre le tampon retienne une certaine quantité de ces ions qui lui permet de former un complexe avec le tARN comme cela est montré dans la figure 31b. Il pourrait également s'agir, comme cela a été évoqué à propos de l'effet labilisateur de ce réactif dans la dénaturation thermique de l'enzyme, d'un effet direct de cette molécule très négativement chargée. La formation du complexe n'est pas affectée par le pyrophosphate qui pourtant, nous l'avons vu, diminue la résistance de l'enzyme au chauffage.

La tARN nucléotidyltransférase forme dans les mêmes conditions qu'avec le tARN un complexe avec l'ARN de TYMV, ainsi qu'avec le fragment 3' terminal qui en dérive après action de l'endonucléase qui contamine les préparations de phosphodiestérase de venin de serpent (119). Elle n'en forme pas, par contre, avec l'ARN ribosomal ou le poly C.

Aucun complexe n'a pu être mis en évidence par la même technique entre la tARN nucléotidyltransférase et les nucléotides. La centrifugation de l'enzyme dans un gradient renfermant du CTP ne modifie pas ses propriétés hydrodynamiques.

CONCLUSION

Les résultats rapportés dans cette partie du travail montrent que la tARN nucléotidyltransférase forme avec le tARN un complexe relativement stable qu'il est possible d'isoler par centrifugation dans un gradient de saccharose ou de glycérol. La formation de ce complexe fait intervenir les ions Mg^{++}. La constante de sédimentation 5,3 S du complexe indique un poids moléculaire inférieur à 90 000 compatible avec une stoechiométrie 1:1 des deux constituants du complexe. La détermination directe de la stoechiométrie n'a pas été effectuée avec

du tARN marqué étant donné que la séparation totale du tARN libre du complexe par les techniques utilisées n'est pas absolue. Les essais d'isolement d'un complexe avec l'ATP ou le CTP ont échoué, les quantités d'enzyme disponibles n'étant pas suffisantes pour permettre d'examiner la formation de tels complexes par d'autres techniques que la centrifugation,(par exemple dialyse à l'équilibre). La mise en évidence des complexes spécifiques entre la tARN nucléotidyltransférase et le tARN offre la possibilité d'examiner la nature des sites qui sont communs à tous les tARN quelle que soit leur spécificité pour les acides aminés et quelle que soit leur origine. En outre elle offre la possibilité extrèmement intéressante de pouvoir détecter des structures identiques ou semblables à celles des tARN qui semblent exister dans les ARN de haut poids moléculaire comme cela a été démontré dans le cas de plusieurs ARN viraux.

RESUME - CONCLUSION GENERALE

La tARN nucléotidyltransférase a été purifiée environ 10^5 fois. La préparation obtenue possède une activité spécifique de 10^6 unités / mg de proteines. La technique de purification comprend, après élimination des acides nucléiques, des chromatographies sur colonne de DEAE-cellulose et d'hydroxyapatite, une filtration sur Sephadex G-100 ou G-200 et une électrofocalisation.

L'enzyme a un poids moléculaire voisin de 40 000 et ne possède pas de sous-unités. Son point isoélectrique est de 6,4.

Elle est capable de resynthétiser, en présence de CTP et d'ATP la séquence 3' terminale -pCpCpA des tARN qui en sont dépourvus, restaurant ainsi leur capacité de charge.

En présence d'un seul de ces nucléotides, ou en présence d'UTP des séquences non normalement présentes dans les tARN sont produites : -pXpA, -pXpCpA, -pXpCpCpC, -pXpU, -pXpUpC, -pXpCpU. La vitesse des réactions conduisant à ces additions anormales est inférieure à celle des synthèses normales.

Le pH optimum de l'activité enzymatique (déterminé pour l'incorporation d'AMP) est élevé : 9,5, comme c'est le cas général pour les diverses tARN nucléotidyltransférases. L'activité enzymatique nécessite la présence de cations divalents mais les besoins sont différents selon la nature du nucléotide incorporé. Le Mg^{++} est nécessaire à l'incorporation de CMP et d'AMP. Il peut être partiellement remplacé par le Mn^{++} en ce qui concerne l'incorporation d'AMP, quelle que soit sa position dans le tARN, mais pas pour l'incorporation de CMP.

L'activité vis à vis de l'UTP, par contre, est plus élevée en présence de Mn^{++} que de Mg^{++}. Un effet synergique de ces deux ions est observé. Il est à remarquer que d'autres enzymes de polymérisation de nucléotides : DNA polymérase, RNA polymérase, présentent le même besoin en Mg^{++} et que le remplacement de celui-ci par le Mn^{++} conduit à des erreurs, par exemple : incorporation de ribonucléotides par la DNA polymérase, initiations incorrectes pour la RNA polymérase. Le rôle exact des ions Mn^{++} dans le fonctionnement anormal des polymérases n'est pas bien connu. Des données récentes (141) semblent montrer qu'il déstabilise la structure des acides nucléiques alors que KCl présente un effet contraire . Il est probable que son rôle dans l'inhibition de l'incorporation du CMP se situe à ce niveau mais on ne peut pas exclure que la nature des complexes entre CTP et Mn^{++} diffère de celle des complexes formés avec le Mg^{++} et que la tARN nucléotidyltransférase ne puisse utiliser que ces derniers.

Les constantes de Michaelis apparentes de l'enzyme pour l'ATP et le CTP dans les réactions conduisant à la synthèse de la séquence -pCpCpA ont été déterminées. Elles sont respectivement de $3{,}3\ 10^{-4}$ M et $1{,}7\ 10^{-5}$ M. La synthèse de la séquence -pCpCpA est processive, l'enzyme peut cependant se détacher du tARN incomplètement terminé. Chacun de ces nucléotides exerce une inhibition non compétitive sur l'incorporation de l'autre. Le Ki apparent de l'ATP est voisin de son K_M, par contre celui du CTP est environ 10 fois supérieur à son K_M apparent. S'il existait un site unique sur l'enzyme pour le CTP et l'ATP l'inhibition devrait être du type compétitif. Ce résultat indique donc l'existence de sites séparés. Un autre argument en faveur de sites différents est apporté par l'étude de l'effet des réactifs des groupements thiols. Ces réactifs inhibent fortement l'activité d'incorporation d'AMP dans le tARN-pXpCpC et très peu celle de CMP. Le ou les groupes thiols impliqués dans l'activité d'incorporation d'AMP peuvent être protégés contre ces réactifs par l'ATP mais pas par le CTP. Ce résultat indique que l'ATP forme un complexe

avec l'enzyme même en l'absence de tARN. Cette propriété est également mise en évidence pour l'ATP et le CTP par l'effet stimulateur qu'ils exercent sur l'inactivation thermique de l'enzyme. L'ensemble de ces résultats montre que la structure du site de fixation de l'ATP est différente de celle du site de fixation du CTP.

Le K_M apparent de l'enzyme à l'égard de l'UTP a également été déterminé ($3,0\ 10^{-4}$M). L'utilisation de ce nucléotide est inhibée par le CTP. L'inhibition est de nature compétitive et le Ki du CTP voisin de son K_M ce qui permet de penser que l'incorporation d'UMP dans le tARN est réalisée par le même site que l'incorporation de CMP. Cette hypothèse est confirmée par l'insensibilité de l'incorporation d'UMP aux réactifs des groupements thiols. L'incorporation "anormale" d'AMP dans le tARN-pX semble, elle aussi, être réalisée par l'intermédiaire du site CTP car elle est insensible aux réactifs des SH. Cependant nous n'avons pas observé d'inhibition compétitive de l'AMP à l'égard du CTP ce qui ne s'expliquerait que si l'affinité du site CTP pour l'ATP est très faible.

La tARN nucléotidyltransférase forme avec les tARN un complexe relativement stable qui peut être caractérisé par centrifugation dans un gradient de saccharose ou de glycérol. Les ions Mg^{++} sont nécessaires pour la formation de ce complexe. Le tARN protège l'enzyme contre la dénaturation thermique et contre la dégradation par les enzymes proteolytiques. De même dans le complexe, le tARN est protégé contre l'action des nucléases.

En ce qui concerne les polynucléotides autres que les tARN, seul l'ARN viral de TYMV forme un complexe relativement stable avec l'enzyme. Cet ARN ou un fragment 5 S de son extrémité 3' terminale sont utilisés par ailleurs comme substrats pour l'addition de CMP et d'AMP. L'enzyme possède très peu ou pas d'affinité pour d'autres polyribonucléotides naturels ou synthétiques rARN, ARN 5 S, poly A ou poly C ... Dans certains cas cependant des complexes non spécifiques avec

certains ARN non substrats peuvent se produire comme l'indiquent les résultats sur la protection ou la sensibilisation par ces ARN. On a constaté par ailleurs, que l'ARN ribosomal et l'ARN 5 S, après une dégradation partielle par des nucléases fournissent des fragments susceptibles d'accepter du CMP.

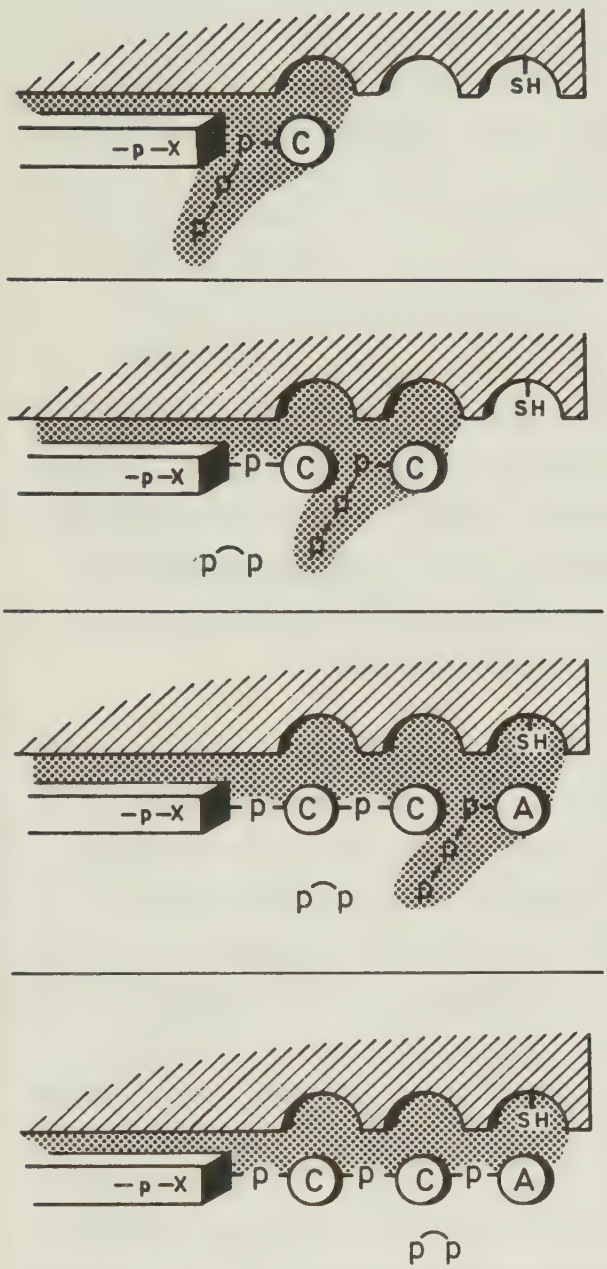
La tARN nucléotidyltransférase est insensible à l'introduction de liaisons covalentes entre bases, à l'intérieur de la molécule de tARN, liaisons rendant plus rigide la structure de la molécule sans entrainer de modifications importantes de sa conformation générale. Par contre, elle est inhibée par les colorants (acridine et bromure d'éthidium) susceptibles, en s'intercalant entre les bases de créer des distorsions importantes des structures en double hélice.

L'enzyme possède des déterminants communs pour les tARN quelle que soit l'intégrité de leur séquence 3' terminale. En outre, les sites particuliers aux nucléotides terminaux pCpCpA pourraient être également ceux des nucléotides triphosphate au cours de la réaction comme le suggère le fait que le tARN-pCpCpA, comme l'ATP, protège l'activité de l'enzyme dans l'incorporation d'AMP contre les réactifs des groupes thiols mieux que les tARN-pXpCpC et pX. Aucun argument ne permet de dire s'il existe 1 ou 2 sites pour le CTP. Certaines tARN nucléotidyltransférases d'origine animale présentent deux K_M pour le CTP sans qu'il ait été possible de relier ces valeurs à l'incorporation de l'un et l'autre des deux CMP de la séquence 3' terminale. Le schéma 32 montre les deux possibilités.

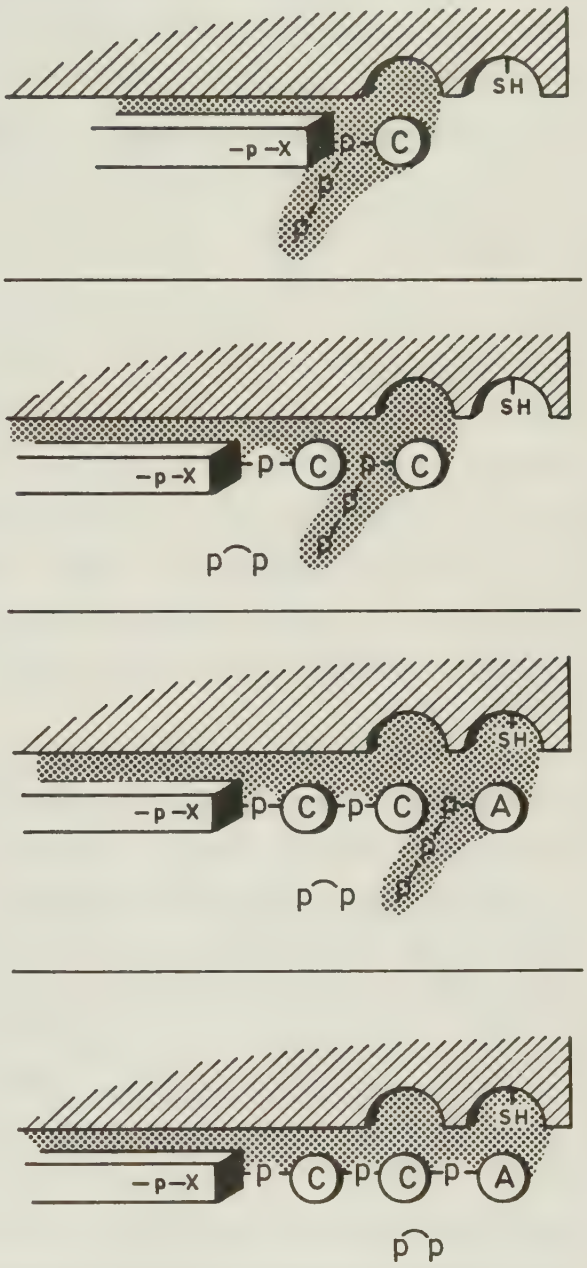
D'autres études seraient nécessaires pour élucider le mécanisme d'action de cet enzyme qui constitue un modèle simplifié de polymérase. D'un poids moléculaire faible, sans sous-unités, il est capable de réaliser la synthèse programmée d'une séquence de trois nucléotides sur des tARN de structure

En présence de CTP et d'ATP la séquence -pXpCpCpA est synthétisée

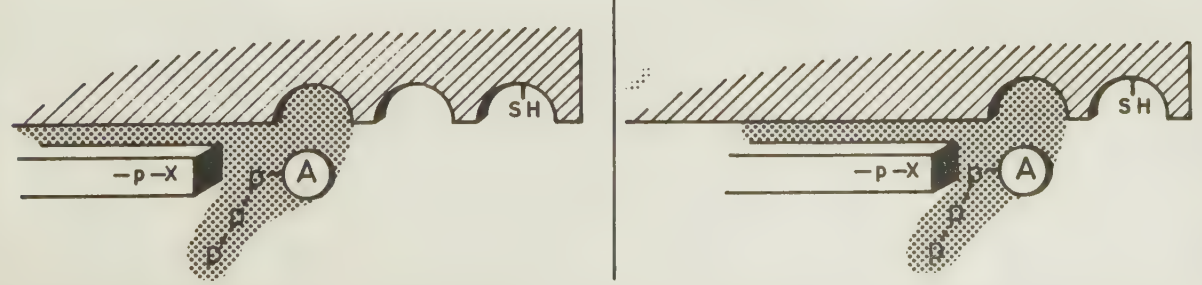
2 Sites CTP



1 Site CTP



Avec l'ATP seul la séquence -pXpA peut être synthétisée



primaire très variées,en mesurant d'une certaine manière la longueur de la molécule de tARN, puisqu'il peut distinguer la séquence pCpCpA terminale de celle, identique, qui la précède dans certains tARN. L'information pour la synthèse de cette séquence peut se trouver dans l'enzyme même, comme c'est le cas par exemple pour les systèmes de synthèse de certains peptides (gramicidines), ou résider dans la molécule de tARN elle-même. La synthèse de la séquence -pCpCpA résulterait, comme l'ont exposé MILLER et PHILIPPS (129), de la transcription d'une région interne de la molécule de tARN. Les deux résidus guanosyl de la boucle dhU sont constants pour toutes les espèces de tARN et, dans le modèle de CRAMER et al. (134), appariés par liaisons hydrogène aux résidus cytidyl de l'extrémité pCpCpA. Ils sont précédés dans presque tous les tARN par un résidu dihydrouracile qui n'est remplacé par un résidu cytidyl que dans un petit nombre de tARN.

La tARN nucléotidyltransférase permet de préparer des tARN à séquence 3' terminale non normalement présente dans les tARN naturels. Ces tARN sont utilisés pour étudier le rôle joué par cette séquence dans le fonctionnement du tARN : le tARN plus long d'un nucléotide que le tARN normal (-pXpCpCpCpA) est reconnu par les aminoacyl tARN synthétases, au moins dans le cas du $tARN^{Phe}$ de levure (91) , alors que le tARN amputé d'un résidu CMP (-pXpCpA) n'est pas fonctionnel (87). Parmi les raisons pour lesquelles de telles synthèses n'ont pas lieu in vivo on peut évoquer le fait qu'ATP et CTP sont toujours ensemble dans la cellule, à des concentrations (128) qui favorisent une synthèse normale.

Le rôle physiologique de la tARN nucléotidyltransférase n'est pas entièrement élucidé. Si à l'heure actuelle on peut admettre qu'elle intervient dans les processus de réparation de l'extrémité -pCpCpA des tARN endommagés par des nucléases, son rôle éventuel dans les processus de maturation qui conduisent aux tARN fonctionnels ne peut pas être exclu.

REFERENCES BIOBLIOGRAPHIQUES

1 - Dependance of aminoacid binding to soluble ribonucleic acid on cytidine triphosphate.
L. HECHT, M. STEPHENSON and P. ZAMECNIK.
Biochim. Biophys. Acta 29, 460, (1958).

2 - The binding of sRNA by Escherichia coli ribosomes.
M. CANNON, R. KRUG and W. GILBERT.
J. Mol. Biol. 7, 360, (1963).

3 - RNA metabolism of intact rabbit reticulocytes.
C. HOLT, E. HERBERT and P. JOEL.
Fred. Proc. 21, 381, (1962).

4 - End-turnover of rat-liver soluble RNA in vivo.
C. SCHOLTISSEK.
Biochim. Biophys. Acta, 61, 499, (1962).

5 - On the instability of transfer-RNA terminal nucleotide sequence in yeast.
R. ROSSET and R. MONIER.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 195, (1963)

6 - Incorporation de ^{32}P dans les acides ribonucléiques de réticulocytes de lapin.
A. BURNY et H. CHANTRENNE.
Biochim. Biophys. Acta 80, 31, (1964)

7 - Instabilité de la séquence 3'-hydroxyle terminale du RNA de transfert chez les microorganismes. I . Etude du renouvellement de l'AMP terminal chez Saccharomyces cerevisiae.
R. ROSSET et R. MONIER.
Biochim. Biophys. Acta 108, 376, (1965).

8 - Turnover of terminal nucleotides of soluble ribonucleic acid in intact reticulocytes.
C. HOLT, P. JOEL and E. HERBERT.
J. Biol. Chem. 241, 1819, (1966).

9 - Modifications du renouvellement de l'AMP final du tRNA dans le foie de rat sous l'influence de divers inhibiteurs de synthèse.
Y. MOULE et R. LANDIN.
FEBS Letters 8, 189, (1970).

10- Instability of the terminal adenosine of soluble ribonucleic acid of Escherichia coli in vivo.
M. CANNON.
Biochim. Biophys. Acta 87, 154, (1964).

11 - Instabilité de la séquence 3'-hydroxyle terminale du RNA de transfert chez les microorganismes. II. Etude du renouvellement de l'AMP terminal chez Escherichia coli en fonction du taux de croissance.
R. ROSSET et R. MONIER.
Biochim. Biophys. Acta 108, 385, (1965).

12 - Further studies concerning end-group instability of soluble ribonucleic acid of Escherichia coli in vivo
M. CANNON.
Biochim. Biophys. Acta 129,221 (1966).

13 - Intégrité de la séquence pCpCpA terminale des tRNA extraits de levure à différents stades de leur croissance.
R. GIEGE et J.P. EBEL.
Biochim. Biophys. Acta 161, 125, (1968)

14 - Specific in corporation of adenosine-5'-phosphate-^{32}P into ribonucleic acid in rat liver homogenates.
C. HEIDELBERGER, E. HARBERS, K. LEIBMAN, Y. TAKAGI, Van R. POTTER.
Biochim. Biophys. Acta 20, 445, (1956).

15 - Terminal incorporation of ^{14}C-AMP into s-RNA by bacterial enzymes.
C. COUTSOGEORGOPOULOS.
Biochim. Biophys. Acta 44, 189, (1960)

16 - The enzymatic synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. IV. The formation of the 3'-hydroxyl-terminal trinucleotide sequence of amino acid-acceptor ribonucleic acid.
J. PREISS, M. DIECKMANN and P. BERG.
J. Biol. Chem. 236, 1748, (1961).

17 - The incorporation of adenylic and cytidylic acids into ribonucleic acid.
J. FURTH, J. HURWITZ, R. KRUG and M. ALEXANDER.
J. Biol. Chem. 236, 3317, (1961).

18 - Purification of transfer-RNA-nucleotidyltransferase from E. coli B.
J. MILLER and G. PHILIPPS.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 1174, (1970).

19 - Purification and properties of Escherichia coli CTP(ATP)-tRNA-nucleotidyltransferase.
D. CARRE, S. LITVAK and F. CHAPEVILLE.
Biochim. Biophys. Acta 224, 371, (1970).

20 - The tRNA pyrophosphorylase activity of Escherichia coli. A study on substrate specificity.
H. GROSS, F. DUERINCK and W. FIERS.
Eur. J. Biochem. 17, 116, (1970).

21 - Studies with tRNA adenylyl(cytidylyl)transferase from Escherichia coli B.
I. Purification and kinetic properties.
A. BEST and G. NOVELLI.
Arch. Biochim. Biophys. 142, 527, (1971)

22 - Purification and characterization of yeast nucleotidyltransferase and investigation of enzyme-transfer ribonucleic acid complex formation.
R. MORRIS and E. HERBERT.
Biochemistry 9, 4819, (1970).

23 - Isolation and properties of tRNA nucleotidyl transferase from yeast.
H. STERNBACH, F. von der HAAR, E. SCHLIMME, E. GARETNER and F. CRAMER.
Eur. J. Biochem. 22, 172, (1971)

24 - Recherches sur la tRNA adenylyl(cytidylyl) transferase de levure.
B. RETHER.
Thèse de Doctorat ès Sciences, Strasbourg, (1972).

25 - Incorporation of labeled ribonucleoside-5'-monophosphate into ribonucleic acid in a cytoplasmic fraction of rat-liver homogenates.
E. HARBERS and C. HEIDELBERGER.
Biochim. Biophys. Acta 35, 381, (1959).

26 - Studies on s-RNA synthesis. II. Assay and method of purification of s-RNA α, β and γ.
E. CANELLAKIS and E. HERBERT.
Biochim. Biophys. Acta 45, 133, (1960).

27 - Incorporation of terminal ribonucleotides into soluble ribonucleic acid by a purified rat liver enzyme.
V. DANIEL and U. LITTAUER.
J. Biol. Chem. 238, 2102, (1963).

28 - Reactions at the 3' terminus of transfer ribonucleic acid. A single enzyme catalyzes the incorporation of adenosine monophosphate and cytidine monophosphate into transfer ribonucleic acid.
M. DEUTSCHER.
J. Biol. Chem. 245, 4225, (1970).

29- The incorporation of nucleotides into amino acid transfer ribonucleic acid.

I. The partial purification and properties of an enzyme catalyzing the incorporation of adenylic acid into the terminal position.
J. STARR and D. GOLDTHWAIT.
J. Biol. Chem. 238, 682, (1963).

30 - Nucleoside triphosphates as precursors of ribonucleic acid end group in a mammalian system.
L. HECHT, P. ZAMECNIK, M. STEPHENSON and J. SCOTT.
J. Biol. Chem. 233, 954, (1958).

31 - Incorporation of adenine nucleotide into ribonucleic acid by cytoplasmic enzyme preparations of chick embryos.
C. CHUNG, H. MAHLER and M. ENRIONE.
J. Biol. Chem. 235, 1448, (1960).

32 - Enzymatic exchange of 3'-terminal AMP in tRNA.
Z. KUCAN and R. CHAMBERS.
FEBS Letters. 25, 156, (1972).

33 - Bacteriophage induced transfer RNA in Escherichia coli. New transfer RNA molecules are synthetized on the bacteriophage genome.
V. DANIEL, S. SARID and U. LITTAUER.
Science 167, 1682, (1970)

34 - Isolation of tyrosine tRNA precursor molecules.
S. ALTMAN.
Nature N.B. 229, 19, (1971).

35 - Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence.
S. ALTMAN and J. SMITH.
Nature N.B. 233, 35, (1971).

36 - Observations on the configuration of nucleotides near the 3'-hydroxy end of adaptater RNA.
G. ZUBAY and M. TAKANAMI.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 204, (1964)

37 - Polynucléotide biosynthesis : formation of a sequence of adenylate units from adenosine triphosphate by an enzyme from thymus nuclei.
M. EDMONDS and R. ABRAMS.
J. Biol. Chem. 235, 1142, (1960).

38 - Uridine nucleotide incorporation into pigeon liver microsome ribonucleic acid.
D. STRAUS and E. GOLDWASSER.
J. Biol. Chem. 236, 849, (1961).

39 - The incorporation of ribonucleotides into ribonucleic acid.
J. HURWITZ and A. BRESLER.
J. Biol. Chem. 236, 542, (1961).

40 - Nature of a polynucleotide required for polyribonucleotide formation from adenosine triphosphate with enzyme from thymus nuclei.
M. EDMONS and R. ABRAMS.
J. Biol. Chem. 237, 2636, (1962)

41 - The incorporation of uridine 5' phosphate into ribonucleic acid by an enzyme preparation from rat liver.
H. KLEMPERER.
Biochim. Biophys. Acta 72, 403, (1963).

42 - Mn^{2+} dependent incorporation of adenosine 5' phosphate into ribonucleic acid by an enzyme from rat liver.
H. KLEMPERER.
Biochim. Biophys. Acta 72, 416, (1963).

43 - Incorporation of adenylic acid into ribonucleic acid and synthetic polynucleotides
P. VENKATARAMAN and H. MAHLER.
J. Biol. Chem. 238, 1058, (1963).

44 - Biosynthèse d'un acide polyadénylique par des extraits de cellules animales.
M-L. GIRON et J. HUPPERT.
Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1677, (1965).

45 - The incorporation of adenylate into polyadenylate and oligoribonucleotides by an enzyme from rat liver.
H. KLEMPERER.
Biochim. Biophys. Acta 95, 251, (1965).

46 - A cytidine triphosphate polymerase from thymus nuclei.
I. Purification and properties of the enzyme and its polynucleotide primer.
M. EDMONDS.
J. Biol. Chem. 240, 4621, (1965).

47 - The synthesis of polyribonucleotides by cytoplasmic enzymes.
J. WYKES and R. SMELLIE.
Bioch. J., 99, 347, (1966).

48 - Characterization of the products formed by the RNA polymerases of cells infected with encephalomyocardites virus.
L. DALGARNO, E. MARTIN, S-L. LIU and T. WORK.
J. Mol. Biol. 15, 77, (1966).

49 - The incorporation of cytidine 5' monophosphate and other ribonucleotides by an enzyme preparation from rat-liver microsome.
M. PAGE, G. HAYNES and H. KLEMPERER.
Biochem. J. 102, 181, (1967).

50 - Polyribonucleotide synthesis by subfractions of microsomes from rat liver.
N. WILKIE and H. SMELLIE.
Biochem. J. 109, 229, (1968).

51 - Chain extension of ribonucleic acid by enzymes from rat liver cytoplasm.
N. WILKIE and R. SMELLIE.
Biochem. J. 109, 485, (1968).

52 - The purification and characterization of adenosine triphosphate ribonucleic acid adenylyltransferase from Pseudomonas putida.
K. PAYNE and J. BOEZI.
J. Biol. Chem. 245, 1378, (1970).

53 - A novel RNA-primed polynucleotidepyrophosphorylase from E. coli.
R. SCHAFFER, W. ZILLIG and H. PRIESS.
FEBS Letters 25, 87, (1972).

54 - Studies on the polymerization of adenylic acid by an enzyme of Escherichia coli.
M. GOTTESMAN, Z. CANELLAKIS and E. CANELLAKIS.
Biochim. Biophys. Acta 61, 34, (1962).

55 - Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation.
I. Purification and properties of the enzyme.
J. AUGUST, P. ORTIZ and J. HURWITZ.
J. Biol. Chem. 237, 3786, (1962).

56 - Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation.
II. Inhibition of polyriboadenylate polymerase activity following bacteriophage infection.
P. ORTIZ, J. AUGUST, M. WATANABE, A. KAYE and J. HURWITZ.
J. Biol. Chem. 240, 423, (1965).

57 - The polynucleotide product of poly A polymerase from Escherichia coli.
S. HARDY and C. KURLAND.
Biochem. 5, 3668, (1966).

58 - Polyriboadenylate polymerase and its inhibition in T_4-infected Escherichia coli and Shigella dysenteriae.
A. COLVILL and M. TERZI.
Biochim. Biophys. Acta 155, 394, (1968).

59 - Polyriboadenylate polymerase and its relationship with RNA polymerase.
M. TERZI, A. CASCINO, C. URBANI.
Nature 226, 1052, (1970).

60 - The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters.
O. LOWRY and J. LOPEZ.
J. Biol. Chem. 162, 421, (1964).

61 - Guanosine 5'-triphosphatase activity of initiation factor f_2.
D. KOLAKOFSKY, K. DEWEY, J. HERSHEY and R. THACH.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 1067, (1968).

62 - Studies of the mechanism of action of polynucleotide phosphorylase.
M. SINGER, R. HILMOE and M. GRUNBERG-MANAGO.
J. Biol. Chem. 235, 2705, (1960).

63 - DNA directed synthesis of RNA by an enzyme from E. coli.
M. CHAMBERLIN and P. BERG.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 81, (1962).

64 - WARBURG and CHRISTIAN
Biochem. Z. 310, 384, (1942).

65 - Protein measurement with the FOLIN reagent.
O. LOWRY, N. ROSENBROUGH, N. FARR, R. RANDALL
J. Biol. Chem. 193, 265, (1951).

66 - Action of venom phosphodiesterase on tRNA from E. coli
J.P. MILLER, M.E. HIRST-BRUNS and G. PHILIPPS.
Biochim. Biophys. Acta 217, 176, (1970).

67 - Binding of transfer ribonucleic acid to ribosomes.
G. PHILIPPS.
J. Biol. Chem. 245, 859, (1970).

68 - The use of the cethyltrimethylammonium cation in the terminal sequence analyses of ribonucleic acids.
J. KHYM and M. UZIEL.
Biochemistry 7, 422, (1968).

69 - Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids
R.K. RALPH and A.R. BELLAMY.
Biochim. Biophys. Acta 87, 9, (1964).

70 - A. FAVRE. Communication personnelle.

71 - Action of spleen exonuclease on transfer ribonucleic acid.
A. BERNARDI and G. CANTONI.
J. Biol. Chem. 244, 1468, (1969).

72 - Protein electrophoresis on polyacrylamide gels.
B.J. DAVIS
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 406, (1964).

73 - Molecular weight determination of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
A.L. SHAPIRO, E. VIÑUELA and J.V. MAIZEL.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815, (1967).

74 - Molecular genetics.
H. MATHAEI and F. GROS.
Springer-Verlag. (sous presse).

75 - Transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase from Escherichia coli. II. Purification, physical properties and substrate specificity.
J.P. MILLER and G.R. PHILIPPS.
J. Biol. Chem. 246, 1274, (1971).

76 - Isoelectric fractionation, analysis and characterisation of ampholytes in natural pH gradients.
H. STÈVENSSON.
Acta Chem. Scand. 15, 325, (1961)

77 - LKB Ampholine column 8101 instruction manual.

78 - Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
J.L. HEDRICK and A.J. SMITH.
Arch. Biochim. Biophys. 126, 155, (1968).

79 - A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes : application to protein mixtures.
R.G. MARTIN and B.N. AMES.
J. Biol. Chem. 236, 1372, (1961).

80 - Reactions at the 3' terminus of transfer ribonucleic acid. II. Purification and physical and chemical properties of rabbit liver transfer ribonucleic acid nucleotidyl-transferase.
M.P. DEUTSCHER.
J. Biol. Chem. 247, 450, (1972).

81 - Stoichiometry of yeast nucleotidyl transferase and effect on the addition reaction of stepwise removal of nucleo-tides from the acceptor end of the transfer ribonucleic acid.
R.W. MORRIS and E. HERBERT.
Biochemistry 9, 4828, (1970).

82 - Reactions at 3' terminus of transfer ribonucleic acid. IV. Extents of normal and anomalous nucleotide incorporation catalyzed by transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase.
M.P.DEUTSCHER. J. Biol. Chem. 247, 469, (1972)

83 - The incorporation of nucleotides into tRNA. The incorporation of uridylic acid.
A. FERNANDEZ-SORENSEN, D.D. ANTHONY and D.A. GOLDTHWAIT.
J. Biol. Chem. 241, 5019, (1966).

84 - Biological activity of Escherichia coli $tRNA^{Phe}$ modified in its C-C-A terminus.
J. TAL, M.P. DEUTSCHER and U.Z. LITTAUER.
Eur. J. Biochem. 28, 478, (1972).

85 - Enzymic incorporation of ribonucleotides and amino acids into transfer ribonucleic acid.
V. DANIEL and U.Z. LITTAUER.
J. Mol. Biol. 11, 692, (1965).

86 - Altered specificity of transfer-ribonucleic acid nucleotidyltransferase in the presence of manganese
H.G. KLEMPERER and G.R. HAYNES.
Biochem. J. 104, 537, (1967).

87 - Studies with tRNA adenylyl(cytidylyl) transferase from Escherichia coli B. II. Regulation of AMP and CMP incorporation into tRNApCpC and tRNApC.
A.N. BEST and GD. NOVELLI.
Arch. Biochim. Biophys. 142, 539, (1971)

88 - Effect of the presence of a pCpCpCpA 3' terminus in Phe-$tARN^{Phe}_{yeast}$ on the interaction with elongation factors and with the poly U-ribosomes system.
M.M. THANG, L. DONDON, D.C. THANG and B. RETHER.
F.E.B.S. Letters 26, 145, (1972).

89 - Reactions at the 3' terminus of transfer ribonucleic acid. III. Catalytic properties of two purified rabbit liver transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase
M.P. DEUTSCHER. J. Biol. Chem. 247, 459, (1972)

90 - Substrate properties of yeast $tRNA^{Phe}$ oxidized and reduced at the 3'-terminal ribose.
F. von der HAAR, E. SCHLIMME, M. GOMEZ-GUILLEN and F. GRAMER. Eur. J. Biochem. 24, 296, (1971)

91 - Cytidylic and adenylic acid incorporation into fragments of tRNA.
H. OVERATH, F. FITTLER, K. HARBERS, R. THIEBE and H.G. ZACHAU. Communication personnelle

92 - The interaction of aminoacridines with nucleic acids.
A.R. PEACOCKE and J.N. SKERRETT.
Trans. Faraday Soc. 52, 261, (1956)

93 - Proflavine binding to transfer ribonucleic acid, synthetic ribonucleic acids and deoxyribonucleic acid.
T. FINKELSTEIN and I.B. WEINSTEIN
J. Biol. Chem. 242, 3763, (1967).

94 - The binding of proflavine to transfer ribonucleic acid : dependance on secondary structure.
H. GROSJEAN, J. WERENNE and H. CHANTERENNE.
Biochim. Biophys. Acta 166, 616, (1968).

95 - Proflavine inhibition of protein synthesis.
I.B. WEINSTEIN and I.H. FINKELSTEIN.
J. Biol. Chem. 242, 3757, (1967).

96 - Effect of proflavine on the binding of isoleucine to transfer RNA.
J. WERENNE, H. GROSJEAN and H. CHANTERENNE.
Biochim. Biophys. Acta 129, 585, (1966).

97 - Peptidyl-tARN hydrolase d'Escherichia coli.
D. PAULIN. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris (1970).

98 - Studies of the binding of ethidium bromide to transfer ribonucleic acid : Absorption, fluorescence, ultra-centrifugation and kinetic investigations.
R. BITTMAN. J. Mol. Biol. 46, 251, (1969).

99 - Reaction of formaldehyde with nucleotides and ribo-nucleic acid.
M. YA FELDMAN. Biochim. Biophys. Acta 149, 20,(1967)

100- Transfer RNA cross-linked with formaldehyde.
V.D. AXELROD, M. Ya. FELDAMN, I.I. CHUGUEV and A.A. BAYEV
Biochim. Biophys. Acta 186, 33, (1969).

101- The photochemistry of 4-thiouridine in Escherichia coli $tARN_1^{val}$.
A. FAVRE, M. YANIV and A.M. MICHELSON.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 266, (1969).

102- Evidence for interaction between two non-adjacent nucleotide residues in $tARN_1^{val}$ from Escherichia coli
M. YANIV, A. FAVRE and B.G. BARRELL.
Nature 223, 1331, (1969)

103- Chemical structures of the TU-C and TU-C^{red} products derived from E. Coli tRNA.
A. FAVRE, B. ROQUES and J-L. FOURREY.
FEBS Letters 24, 209, (1972).

104- Biological activity of irradiated $tRNA^{val}$ containing a 4-thiouridine-cytosine dimer.
M. YANIV, A. CHESTIER, F. GROS and A. FAVRE.
J. Mol. Biol. 58, 381, (1971)

105- Cross-linked transfer RNA functions in all steps of translation process.
L.J. CHAFFIN, D.R. OMILIANOWSKI and R.M. BOCK.
Science 172, 854, (1971).

106- Biological activity of cross-linked Escherichia coli $tRNA_f^{met}$
F. BERTHELOT, F. GROS and A.FAVRE.
Eur. J. Biochem. 29, 343, (1972).

107- Introduction of an intramolecular fluorescent probe in E. coli $tRNA_1^{val}$
A. FAVRE and M. YANIV. FEBS Letters 17, 236, (1971).

108- An identical 3' terminal sequence in ten reovirus genome RNA fragments.
A.K. BANERGEE and M.A. GRECE.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1518, (1971).

109- Esterification enzymatique du RNA du virus de la mosaique jaune du navet par la valine.
P. YOT. Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris (1970)

110- Enzymatic binding of valine to 3' end of TYMV-RNA.
M. PINCK, P. YOT, F. CHAPEVILLE and H.M. DURANTON.
Nature 226, 954, (1970).

111- Valine-specific tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA.
P. YOT, M. PINCK, A-L. HAENNI, H.M. DURANTON and F. CHAPEVILLE
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 1345, (1970)

112- TYMV-RNA as a substrate of the RNA-nucleotidyltransferase.
S. LITVAK, D.S. CARRE and F. CHAPEVILLE.
FEBS Letters 11, 316, (1970).

113- TYMV as substrate for tRNA nucleotidyltransferase. Incorporation of CMP and determination of a short sequence at the 3' end.
S. LITVAK, L. TARRAGO-LITVAK and F. CHAPEVILLE.
Nature, sous presse.

114- H. ROBERTSON.
Symposium of the Société de Chimie Biologie, Strasbourg (1971).

115- TYMV RNA a a substrate of the tRNA maturation endonuclease.
A. PROCHIANTZ and A.L. HAENNI. Nature, sous presse.

116- Etude de la tARN-nucléotidyltransférase de Escherichia coli : Utilisation pour l'étude d'un ARN viral; Insolubilisation de l'enzyme par couplage au Sepharose.
S. LITVAK. Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris,(1972)

117- Elongation factor-viral genome interaction dependant on the aminoacylation of the TYMV and TMV RNAs.
S. LITVAK, A. TARRAGO, L. TARRAGO-LITVAK and J. ALLENDE.
Nature, sous presse.

118- TYMV valyl-RNA as an amino acid donor in protein biosynthesis.
A.L. HAENNI, A. PROCHIANZ, O. BERNARD and F. CHAPEVILLE.
Nature, sous presse.

119- Valine specific tRNA-like structure in RNAs of two viruses of turnip yellow mosaic virus group.
M. PINCK, S.K. CHAN, M. GENEVAUX, L. HIRTH and H. DURANTON
Biochimie, 54, 1093, (1972).

120- Enzyme-mediated binding of tyrosine to brome-mosaic-virus ribonucleic acid.
T.C. HALL, D.S. SHIH and P. KAESBERG.
Biochem. J. 129, 969, (1972).

121- Binding of histidine to tobacco mosaic virus RNA.
B. OBERG and L. PHILIPSON.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 927, (1972).

122- Bacteriophage Qβ replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts.
T. BLUMENTHAL, T.A. LANDERS and K. WEBER.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1313, (1972).

123- In vitro synthesis of $tRNA^{tyr}$ precursors and their conversion to 4 S RNA.
H. IKEDA. Nature N.B. 234, 198, (1971)

124- Effect of bacteriophage infection on the sulfur-labelling of sRNA.
W.T. HSU, J. FOFT and S. WEISS.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 2028, (1967).

125- The induction of tRNA synthesis following T_4 phage infection.
U. LITTAUER and V. DANIEL.
J. Cell. Phys. 74, 71, (1969).

126- Amino acid acceptor activity of bacteriophage T_4 transfer RNA.
V. DANIEL, S. SARID and U. LITTAUER.
FEBS Letters 2, 39, (1968).

127- Coding by T_4 phage DNA of soluble RNA containing pseudouridylic acid.
V. DANIEL, S.SARID and U. LITTAUER.
Proc. Natl. Acad. Sci; U.S. 60, 1403, (1968).

128- Transfer RNA coded by the T_4 bacteriophage genome.
S. WEISS, W.T. HSU, J. FOTT and N. SCHERBERG.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 114, (1968).

129- Detection of bacteriophage T_4 - and T_5 - coded transfer RNA.
N. SCHERBERG and S. WEISS.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 1164, (1970).

130- T_4 Transfer RNAs : codon recognition and translational properties.
N. SCHERBERG and S. WEISS.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1114, (1972).

131- Evidence for early synthesis of T_4 bacteriophage-coded transfer RNA.
N. SCHERBERG, A. GUHA, W.T. HSU and S. WEISS.
Biochem. Biophys. Research. Comm. 40, 919, (1970).

132- J.M. BUHLER. Résultats non publiés.

133- The synthesis and properties of the Sepharose-bound tARN nucleotidyltransferase.
S. LITVAK, L. TARRAGO-LITVAK, D. CARRE and F. CHAPEVILLE
Eur. J. Biochem. 24, 249, (1971).

134- Transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase from Escherichia coli. III. Kinetic analysis.
J.P. MILLER and G.R. PHILIPPS.
J. Biol. Chem. 246, 1280, (1971).

135- The incorporation of nucleotides into amino acid transfer RNA. II. Evidence for separate enzymatic sites for incorporation of AMP and CMP.
D.D. ANTHONY, J.L. STARR, D.S. KERR and D.A. GOLDTHWAIT.
J. Biol. Chem. 238, 690, (1963).

136- E.T. BOLTON and R.B. ROBERTS.
Studies of macromolecular biosynthesis.
Carnegie Inst. Washington Publ. 624, 61, (1964).

137- Studies on thermal inactivation of transfer ribonucleic acid nucleotidyltransferase from Escherichia coli.
J.P. MILLER and G.R. PHILIPPS
Biochemistry 10, 1001, (1971).

138- Selective recognition of native conformation of transfer ribonucleic acids by enzymes.
T. LINDAHL, A. ADAMS, M. GEROCH and J.R. FRESCO.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 178, (1967).

139- Formation of the complex between CCA-enzyme and transfer RNA.
H. HONDA. Biochim. Biophys. Acta 195, 587, (1969).

140- Conformational aspects and reactivity of DNA. Effect of manganese and magnesium ions on interaction with DNA.
G. LUCK and C. ZIMMER.
Eur. J. Biochem. 29, 528, (1972).

141- On the conformation of transfer RNA.
F. CRAMER, H. DOEPNER, F. v. d. HAAR, E. SCHLIMME and H. SEIDEL.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 1384, (1968).